

Aus der anatomischen Anstalt – Lehrstuhl I
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Der Einfluss von Desmoglein 2 auf die Malignität von Pankreaskarzinom-Zelllinien

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julian David Sebastian Zeiler

aus München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Spindler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Haas
Prof. Dr. Julia Mayerle

Dekan: Prof. Dr. med. dent. R. Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2021

Meinen Eltern in Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathologie	1
1.1.3	Pathogenese	2
1.1.4	Therapie	3
1.2	Interzelluläre Adhäsion.....	5
1.2.1	Desmosomen	5
1.2.2	Desmosomale Cadherine	7
1.2.3	Der Einfluss von cAMP auf interzelluläre Adhäsion	9
1.3	Pathophysiologie gestörter interzellulärer Adhäsion	9
1.3.1	Erkrankungen mit desmosomaler Beteiligung	9
1.3.2	Desmosomen und die Pathogenese und Progression maligner Neoplasien	10
1.4	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Zellkultur.....	13
2.1.1	Wildtyp-Zelllinien	13
2.1.2	shRNA DSG2-Knockdown Zellklone.....	14
2.1.3	Generierung von DSG2-Knockout-Zellklonen mittels CRISPR/Cas9.....	15
2.1.3.1	Einführung CRISPR/Cas	15
2.1.3.2	Verwendete CRISPR/Cas9-Plasmide	16
2.1.3.3	Transformation und Isolation der Plasmide.....	17
2.1.3.4	Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA.....	18
2.1.3.5	Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese	19
2.1.3.6	Transfektion	19
2.1.3.7	Zellvereinzelung	20
2.1.3.8	Kulturbedingungen	21
2.1.3.9	Screening auf DSG2-Knockouts	21
2.1.3.10	DNA-Extraktion und Sequenzierung	22

2.2	Quantitative Protein-Immunodetektion (Westernblotting)	23
2.2.1	Herstellung von Zelllysaten	23
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.4	Western-Blot und Immundetektion	25
2.3	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	26
2.4	EdU-Proliferationsassay	27
2.5	Migrations-Assay	28
2.6	Lebendzell-Mikroskopie und Phänotypisierung während Migration	28
2.7	cAMP-Assay	29
2.8	Analyse und statistische Auswertung des Bild- und Datenmaterials	30
2.9	Verwendete Reagenzien	31
2.9.1	Antikörper und Mediatoren	31
2.9.2	Puffer und Lösungen	33
3	Ergebnisse	36
3.1	Charakterisierung verwendeter Zelllinien	36
3.1.1	Wildtyp-Zelllinien	36
3.1.2	shRNA DSG2-Knockdown-Zelllinien	37
3.1.3	CRISPR/Cas9 DSG2-Knockout-Zelllinien	39
3.2	Die Auswirkungen eines DSG2-Verlusts auf Pankreaskarzinom-Zellen	44
3.2.1	Verlust von DSG2 verstärkt Migration	44
3.2.2	DSG2-Verlust hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate	45
3.2.3	Verlust von DSG2 führt zur Reduktion des epithelialen Phänotyps	45
3.2.4	Durch DSG2-Verlust beeinflusste Signalwege und Proteinexpression	46
3.2.4.1	Verringerung der Plakoglobin-Expression	47
3.2.4.2	Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs	47
3.3	Einfluss von cAMP auf Signalwege und Phänotyp von AsPC-1-Zellen	50
3.3.1	Erhöhung der cAMP-Spiegel verringert Migration	51

3.3.2	Erhöhung der cAMP-Spiegel stellt epithelialen Phänotyp wieder her	52
3.3.3	Erhöhung der cAMP-Spiegel blockiert ERK-Aktivierung.....	53
3.3.4	DSG2-Verlust führt zur Erhöhung der basalen cAMP-Spiegel	54
4	Diskussion	56
4.1	Verlust von Desmoglein 2 führt zu malignerem Phänotyp in PDAC-Zellen	56
4.1.1	Verstärkung der Migration.....	56
4.1.2	Reduktion des epithelialen Phänotyps	57
4.2	Tumorigene Signalwege als Vermittler der DSG2 assoziierten Migrationssteigerung und Reduktion des epithelialen Phänotyps.....	60
4.3	cAMP blockiert Migration und die Reduktion des epithelialen Phänotyps über ERK1/2- und Slug-Inhibitor	62
4.4	Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung.....	67
6	Verzeichnisse.....	68
6.1	Literaturverzeichnis	68
6.2	Abbildungsverzeichnis	78
6.3	Tabellenverzeichnis	79
6.4	Abkürzungsverzeichnis	80
7	Anhang	83
7.1	Publikationen.....	83
7.2	Danksagung	85
7.3	Eidesstattliche Versicherung.....	87

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom weist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 9 % für Männer und 10 % für Frauen die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen in Deutschland auf und ist insgesamt die vierthäufigste Krebstodesursache hierzulande. Diese ausgesprochen schlechte Prognose ist hauptsächlich auf den Mangel spezifischer Symptome früher Tumorstadien und der damit verbundenen späten Diagnosestellung, sowie der frühen und aggressiven Metastasierung dieser Tumorentität zurückzuführen (Krebsregister, 2017, Leitlinienprogramm-Onkologie, 2013). Folglich können nur mehr ca. 15 - 20% aller diagnostizierten Patienten primär kurativ (chirurgisch) behandelt werden. Ein metastasiertes oder lokalinvasiv inoperables Pankreaskarzinom (evtl. nach neoadjuvanter Therapie) gilt bis heute als nicht kurabel (Oettle et al., 2018).

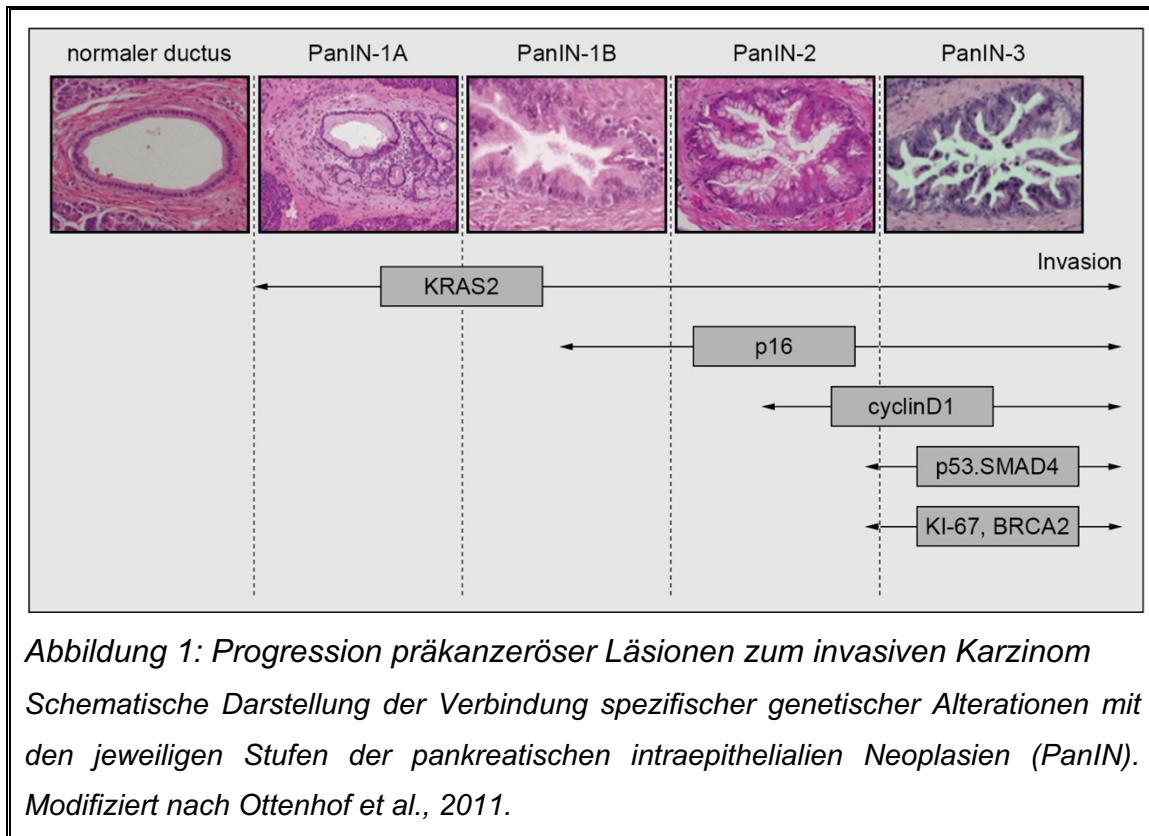
1.1.2 Pathologie

Pankreaskarzinome lassen sich histologisch in verschiedene Subtypen einteilen. Der mit über 90 % mit Abstand häufigste Subtyp ist das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC = engl. pancreatic ductal adenocarcinoma) (Fauci and Harrison, 2008). Daher wird in dieser Dissertation der Fokus auf diesen Subtyp gelegt und die Bezeichnung Pankreaskarzinom synonym zum dukталen Adenokarzinom verwendet. Andere Subtypen sind beispielsweise Inselzelltumore und neuroendokrine Tumore des Pankreas (Fauci and Harrison, 2008). In der jüngeren Vergangenheit konnten durch Genomanalysen weitere Subtypen identifiziert werden, deren Einteilung sich nach spezifischen Mutationsmustern richtet. Diese molekularen Subtypen sind: Squamöses Pankreaskarzinom, Vorläufer-Pankreaskarzinom, immunogenes Pankreaskarzinom und aberrierend differenziertes endokrin-exokrines Pankreaskarzinom. So exprimieren Vorläufer-Pankreaskarzinome beispielsweise besonders stark Gene, die in der frühen Entwicklung des Pankreas beteiligt sind, wohingegen beim immunogenen Pankreaskarzinom Signalwege mit immunsupprimierenden Effekten verstärkt aktiviert sind (Bailey et al., 2016). Weiter existieren Modelle, die das Pankreaskarzinom ebenfalls auf Basis ihrer Genexpression in stroma- oder tumorspezifische Subtypen unterteilen (Moffitt et al., 2015). Gemein ist all diesen

modernen molekularen Typisierungsmodellen das Ziel, das Pankreaskarzinom zielgerichteten Therapien besser zugänglich zu machen.

1.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese des Pankreaskarzinoms basiert, wie bei allen Krebserkrankungen, auf dem Prinzip der Mutation protoonkogener, bzw. tumorsuppressiver Gene. Entscheidend für die Entstehung eines malignen Tumors ist jedoch nicht die Mutation einzelner spezifischer Gene, sondern vielmehr das Zusammenspiel verschiedener Mutationen. Die Beeinträchtigung, bzw. Deregulierung unterschiedlicher zellulärer Funktionen bis zur Entstehung eines hochmalignen Tumors wird als ein sich ergänzender Prozess angesehen. Weiter wird vermutet, dass dieser Prozess hin zum invasiven Pankreaskarzinom im Durchschnitt mehr als ein Jahrzehnt dauert und verschiedene nicht-invasive Vorstufen durchlaufen werden (Ottenhof et al., 2011, Ying et al., 2016). Zu den wichtigsten Vorstufen des PDAC zählen die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) und die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) (Singh and Maitra, 2007). Unter diesen ist die bei Weitem häufigste Form die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (Ottenhof et al., 2011). Diese lässt sich anhand des Grades nukleärer Atypien und strukturell histologischer Veränderungen in drei Kategorien einteilen: PanIN-1 (früher unterteilt in PanIN-1A und PanIN-1B), PanIN-2, und PanIN-3 (Basturk et al., 2015). Die genaue Untersuchung und Charakterisierung der verschiedenen Pankreaskarzinom-Vorstufen sind entscheidend für das detaillierte molekularbiologische Verständnis der Pathogenese hin zum invasiven Karzinom. So konnten in den vergangenen Jahren spezifische Mutationen den einzelnen PanINs zugeordnet werden und dadurch entscheidende Meilensteine für die Entwicklung zum malignen Pankreastumor identifiziert werden. Abbildung 1 zeigt die wichtigsten Protoonkogene und Tumorsuppressoren in Beziehung zu den jeweiligen Stadien der Pankreaskarzinom-Vorläuferläsionen.



Als wichtigste und häufigste (>90 % in PDAC) dieser Mutationen ist die Aktivierung von KRAS hervorzuheben. Ras, ein monomeres G-Protein und das Produkt des KRAS Protoonkogens, fungiert als bedeutsamer Signalgeber für viele das Zellwachstum fördernde Signalwege. Durch spezifische Punktmutationen wird die intrinsische GTPase-Aktivität dieses Proteins herabgesetzt und meist zusätzlich die Wirkung GTPase-aktivierender Proteine blockiert. Folglich kommt es zur konstitutiven Aktivierung von Ras und damit zur permanenten Stimulation von nachgeschalteten onkogenen Signalwegen (Eser et al., 2014, Pylayeva-Gupta et al., 2011). Als einer der drei, für die Malignität des Tumors entscheidendsten Ras-abhängigen onkogenen Signalwege, wird der kanonische MAP-Kinase Signalweg angesehen (Eser et al., 2014, Collisson et al., 2012).

1.1.4 Therapie

Bei der heutzutage gängigen Therapie des Pankreaskarzinoms ist zwischen bei Diagnosestellung operablen Tumoren und lokalinvasiv inoperablen bzw. metastasierten Tumoren zu unterscheiden.

Die einzige kurative Therapie ist die vollständige chirurgische Resektion des Tumors (Doi et al., 2008). Klassischerweise besteht diese aus einer partiellen Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pyloruserhalt nach Whipple bzw.

Traverso-Longmire (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2013). Postoperativ werden diese Patienten in der Regel adjuvant mit 5-Fluoruracil oder Gemcitabin zytostatisch behandelt (Seufferlein et al., 2014), was die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 10,4 % ohne Chemotherapie auf 20,7 % mit Chemotherapie erhöht (Oettle et al., 2013).

Bei primär nicht resektablen Tumoren ohne Fernmetastasen kann durch eine neoadjuvante (Radio-)Chemotherapie Operabilität erreicht werden. Bislang gibt es für dieses Therapieverfahren jedoch keine in letzter Konsequenz belastbaren Daten (Seufferlein et al., 2014). Genaue Kriterien für die Resektabilität sind beispielsweise der Grad der Umwachsung der Vena mesenterica superior oder eine Invasion der Aortenwand (Callery et al., 2009).

Beim metastasierten, bzw. lokal fortgeschrittenen inoperablen Pankreaskarzinom ist eine palliative Behandlung indiziert. Standard war hierbei lange Zeit die Chemotherapie mit Gemcitabin (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2013, Burris et al., 1997). Nach neueren Daten wird eine Kombination verschiedener Zytostatika (z.B. FOLFIRINOX) empfohlen, wobei die Wahl der für den individuellen Patienten effektivsten Wirkstoffkombination bis heute schwierig bleibt (Chin et al., 2018). Generell sind Zytostatika derzeit die einzigen etablierten systemischen Therapeutika für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom, welche einen nachgewiesenen Nutzen für den Patienten haben. Jedoch ist das Pankreaskarzinom insgesamt systemisch nur sehr limitiert therapierbar. Eine Chemotherapie bewirkt durchschnittlich eine Lebenszeitverlängerung von lediglich wenigen Monaten unter der Gefahr schwerer Nebenwirkungen und einer Verschlechterung der Lebensqualität (Saung and Zheng, 2017). Weiter gibt es bis heute annähernd keine wirksame zielgerichtete medikamentöse Therapie („targeted cancer therapy“) für das Pankreaskarzinom. Zwar konnten viele präklinische und klinische Studien vielversprechende Ergebnisse zeigen, aufgrund der großen histopathologischen Heterogenität des Pankreaskarzinoms sowie komplexer Interaktionen mit dem umgebenden Stroma, konnten jedoch keine signifikanten Verbesserungen im Patientenüberleben erreicht werden (Adamska et al., 2017). Eine Ausnahme bildet der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) Inhibitor Erlotinib. Hier konnte eine signifikante Verlängerung des mittleren Überlebens gezeigt werden, wenn zum üblichen Gemcitabin-Regime Erlotinib verabreicht wurde (Moore et al., 2007). Aufgrund der geringen Effektstärke

(Lebensverlängerung von ca. 2 Wochen) brachte diese Therapie jedoch nicht den gewünschten Durchbruch.

Zusammenfassend lässt sich aus dem Mangel effektiver systemischer Therapien ein großer Bedarf für eine tiefere grundlegende Erforschung des Pankreaskarzinoms ableiten. Besonders basale molekularbiologische und genetische Faktoren, sowie grundlegende zelluläre Eigenschaften könnten den Grundstein für zukünftige, effektive, zielgerichtete und dem individuellen Patienten angepasste Therapien legen.

1.2 Interzelluläre Adhäsion

Intakte Haftung zwischen den Zellen ist essenziell für die mechanische und funktionelle Integrität von Geweben sowie der korrekten Reparatur von Defekten (Huber and Petersen, 2015). Diese Art der Adhäsion wird primär über die sogenannten Adhäsionskontakte vermittelt, welche sich in Desmosomen und Adhärenskontakte unterteilen lassen. Beide Formen von Adhäsionskontakten haben große strukturelle Ähnlichkeit und weisen zwei Grundkomponenten auf: Transmembranproteine, welche die direkte interzelluläre Interaktion vermitteln, sowie Plaque-Proteine als intrazelluläre Stabilisatoren der Transmembranproteine und Vermittler der Anheftung an zytoskelettale Filamente zur mechanischen Stärkung der Adhäsionskontakte. Unterschiede bestehen unter anderem in den spezifischen Proteinen, der Geometrie der Kontakte und den verknüpften Filamenten (Lüllmann-Rauch, 2015).

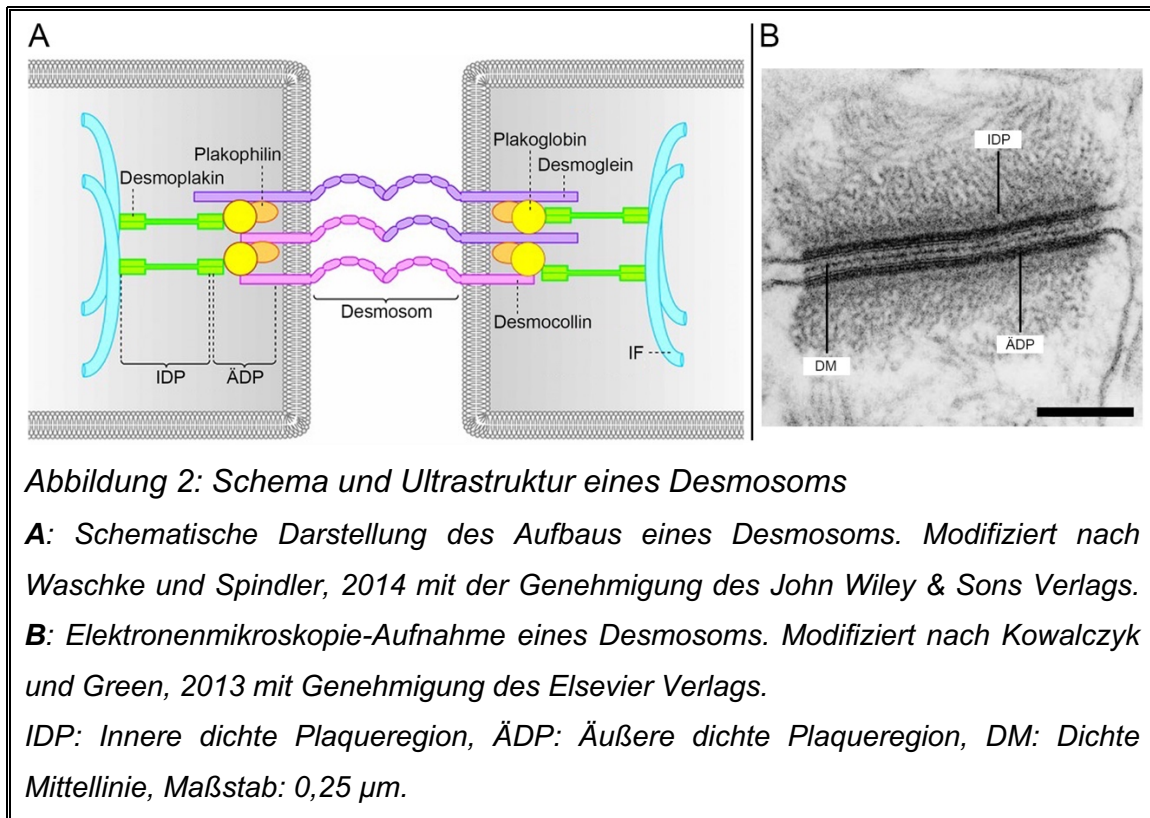
Die folgenden Kapitel fokussieren sich auf die desmosomale Komponente interzellulärer Adhäsion, den Feinbau und die Funktion von Desmosomen, sowie auf ihre spezifischen Transmembranproteine, die desmosomalen Cadherine.

1.2.1 Desmosomen

Desmosomen (gr. „desmos“ = Bindung und „soma“ = Körper), die auch als Maculae adhaerentes bezeichnet werden, sind fleckförmige Interzellulärkontakte aus der Gruppe der Adhäsionskontakte (Dubash and Green, 2011). Ihre Hauptfunktion ist das Vermitteln mechanischer Stabilität innerhalb eines Gewebes (Thomason et al., 2010, Kowalczyk and Green, 2013). Besonders zahlreich sind Desmosomen in Geweben anzutreffen, deren mechanische Beanspruchung hoch ist, wie zum Beispiel der Haut, dem Herz oder der gastrointestinalen Mukosa. Sie kommen jedoch in allen einschichtigen Epithelien und manchen nicht epithelialen

Zellen vor. So sind sie essenzieller Bestandteil der Schlussleistenkomplexe polarisierter Epithelien (Waschke, 2008).

Ein Desmosom setzt sich jeweils aus den von zwei benachbarten Zellen ausgebildeten Hälften zusammen. Dabei wird ein interzellulärer Spalt von ca. 34 nm überbrückt und die Transmembranproteine der Desmosomen treten in direkten Kontakt (Garrod and Chidgey, 2008, Al-Amoudi et al., 2004). In Abbildung 2 ist schematisch der Aufbau eines Desmosoms dargestellt.



Desmosomen setzen sich aus Proteinen dreier unterschiedlicher Familien zusammen: Den Cadherinen (*Ca²⁺-dependent adhesion molecules*), den Armadillo-Proteinen und den Plakinen. Die desmosomalen Cadherine (Desmogleine und Desmocolline) sind Transmembran-Glykoproteine, welche mit den Cadherinen der jeweiligen benachbarten Zelle im Extrazellulärraum interagieren (Waschke, 2008). An ihrem zytosolischen Ende sind die Cadherine an Proteine der Armadillo-Familie (Plakoglobin (PG) und Plakophilin) gebunden, welche in der sogenannten äußeren dichten Plaqueregion (ADP) die intrazelluläre Verankerung der desmosomalen Cadherine vermitteln (Delva et al., 2009, Waschke, 2008, Getsios et al., 2004). In der inneren dichten Plaqueregion (IDP) vermittelt Desmoplakin, ein Mitglied der Plakin-Familie zytoskelettaler Adapterproteine, die Verbindung des desmosomalen Komplexes aus Cadherinen

und Armadillo-Proteinen zum Intermediärfilament-Netzwerk der Zelle (Dubash and Green, 2011, Spindler and Waschke, 2014). Neben ihrer Eigenschaft als reine Adhäsionskontakte sind Desmosomen, bzw. ihre einzelnen Komponenten, auch in Signalwegen anzutreffen (Waschke, 2008). Innerhalb der letzten ein bis zwei Dekaden wurden immer mehr Signalwege entdeckt, die durch desmosomale Proteine beeinflusst werden (Dubash and Green, 2011). Besonders die Proteine der Armadillo-Familie spielen in der Regulation der Gentranskription eine entscheidende Rolle (Huber and Petersen, 2015). Darunter besitzt speziell Plakoglobin regulatorische Eigenschaften in Bezug auf die Zellproliferation (Balda, 2003). Doch auch desmosomale Cadherine sind in Signalwege eingebunden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Desmoglein 1 über eine Suppression des EGFR-MAPK-Signalwegs (engl. *epidermal growth factor receptor - mitogen activated protein kinase*) die epidermale Differenzierung beeinflusst (Dubash and Green, 2011). Weiter werden Desmosomen heutzutage mehr und mehr als hochdynamische Strukturen betrachtet, die maßgeblich an der Signaltransduktion extrazellulärer Signale nach intrazellulär und vice versa beteiligt sind (Broussard et al., 2015, Celentano et al., 2017).

1.2.2 Desmosomale Cadherine

Desmosomale Cadherine sind wie die klassischen Cadherine der Adhärenskontakte Ca^{2+} -abhängige integrale Membran-Glykoproteine (Getsios et al., 2004, Garrod et al., 2002). In den Desmosomen kommen zwei verschiedene Typen von Cadherinen vor: Desmogleine und Desmocolline. Die auf Chromosom 18 liegenden Gene für diese Cadherine kodieren für vier verschiedene Desmogleine (DSG1-4) und drei Desmocolline (DSC1-3). Grob lassen sich Desmogleine und Desmocolline, welche auch unter dem Begriff Desmocadherine zusammengefasst werden, von N-terminal nach C-terminal in fünf Abschnitte unterteilen: Vier Extrazellulärdomänen (EC1-4), einen extrazellulären Anker, eine Transmembrandomäne, einen intrazellulären Anker und zusätzliche zytosolische Domänen (Getsios et al., 2004). Jeder dieser Abschnitte erfüllt eine spezifische Funktion. Besonders zu erwähnen ist hierbei die sogenannte CAR-Aminosäuresequenz (engl. *cell adhesion recognition*) der EC1, welche die Bindung zum Cadherin der gegenüberliegenden Zelle vermittelt. Im Detail kommt es zum Austausch der amino-terminalen Beta-Stränge zwischen den jeweiligen gepaarten Cadherinen. Schlüsselement ist hierbei die Einlagerung des Indolrings eines

hochkonservierten Tryptophans an Position 2 (Trp2) in eine hydrophobe „Tasche“ der gegenüberliegenden EC1 (Shapiro and Weis, 2009, Harrison et al., 2016). Desmocadherine können im Gegensatz zu klassischen Cadherinen sowohl homophil, das heißt mit Cadherinen des gleichen Typs (z.B. DSG und DSG), als auch heterophil (z.B. DSG und DSC) aneinander binden (Green et al., 2019). Passend dazu weisen die extrazellulären Domänen verschiedener Desmocadherine große strukturelle Ähnlichkeit auf. Im Gegensatz dazu zeigen die zytosolischen Domänen stärkere Variabilität. Gemeinsam ist nahezu allen Desmogleinen und Desmocollinen die sogenannte ICS (engl. intracellular cadherin typical sequence), welche die Bindung an Plakoglobin und die Plakophiline vermittelt. Die Funktion weiterer Desmoglein-spezifischer C-terminal der ICS liegender zytosolischer Domänen, speziell der IPL (engl. intracellular proline-rich linker domain), der RUD (engl. repeated-unit domain) und der DTD (engl. desmoglein specific terminal domain) ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Eine Rolle in der Vermittlung intrazellulärer Signale wurde in ersten Zügen nachgewiesen (Amagai, 2010, Getsios et al., 2004, Kowalczyk and Green, 2013, Al-Amoudi et al., 2011, Harmon et al., 2013).

Ein weiterer Unterschied zwischen den jeweiligen Desmoglein- und Desmocollin-Isoformen ist deren Distribution im menschlichen Organismus. Während Desmoglein 1 und 3, sowie Desmocollin 1 und 3 auf mehrschichtige Plattenepithelien beschränkt sind und Desmoglein 4 zum Beispiel in Haarfollikeln oder höher differenzierten Schichten der Epidermis zu finden ist (Bazzi et al., 2006), kommen DSG2 und DSC2 in praktisch allen Epithelien vor, die desmosomal stabilisiert sind (Dusek et al., 2007). Als am weitesten verbreitet wird jedoch DSG2 angesehen. Besonders im Myokard und in einschichtigem Epithel, zu dem auch das duktales pankreatisches Epithel zählt, nimmt Desmoglein 2 eine vorherrschende Rolle ein (Hartlieb et al., 2013, Schafer et al., 1994). So ist beispielsweise dessen Vorhandensein in intestinaler Mukosa essenziell für die Integrität und Funktion der epithelialen Barriere (Schlegel et al., 2010, Gross et al., 2018). Weiter konnten in den letzten Jahren mehrere Signalwege in unterschiedlichen Geweben identifiziert werden, welche durch DSG2 beeinflusst werden (Yulis et al., 2018, Overmiller et al., 2016, Kamekura et al., 2014). Zusammenfassend deuten die gesammelten Forschungsergebnisse vergangener Jahrzehnte darauf hin, dass DSG2 besonders in einschichtigen Epithelien (Hartlieb et al., 2013) eine vielseitige und wichtige

Rolle für die Aufrechterhaltung epithelialer Integrität sowie der gewebespezifischen Funktionen einnimmt.

1.2.3 Der Einfluss von cAMP auf interzelluläre Adhäsion

Cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) ist eines der am besten erforschten sekundären Signalmoleküle des menschlichen Körpers. Viele verschiedene hormonelle Signale vermitteln ihre Wirkung über die Beeinflussung intrazellulärer cAMP-Spiegel (Cooper et al., 1995). So konnte auch gezeigt werden, dass cAMP über die Stärkung zellulärer Adhäsion und des kortikalen Aktin-Zytoskeletts die Integrität von Endothelbarrieren positiv beeinflusst (Spindler and Waschke, 2011). Ausgehend von diesen Ergebnissen entstand die Hypothese, dass cAMP ebenso in Pankreaskarzinom-Zellen verschiedene Adhäsionseigenschaften beeinflussen und somit Auswirkungen auf die Malignität dieser Zellen haben könnte.

1.3 Pathophysiologie gestörter interzellulärer Adhäsion

Wie in den vorangehenden Kapiteln dargelegt wurde, ist Zelladhäsion im Allgemeinen und desmosomale Adhäsion im Speziellen für epitheliale Gewebe von immenser Bedeutung. Daher verwundert es nicht, dass gestörte interzelluläre Adhäsion zu einer Vielzahl von Pathologien führen kann. Zu diesen Pathologien zählen multiple Formen von Autoimmun-, Krebs-, Infektions- und genetischen Erkrankungen (Celentano et al., 2017).

1.3.1 Erkrankungen mit desmosomaler Beteiligung

Als einer der bekanntesten Vertreter von Erkrankungen mit desmosomaler Beteiligung ist die Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris zu nennen. Durch Autoantikörper gegen DSG1 und 3 wird die Zelladhäsion innerhalb des (muko-)kutanen Plattenepithels so stark gestört, dass sich durch intraepidermale Spaltbildung flüssigkeitsgefüllte Blasen bilden (Amagai and Stanley, 2012, Spindler and Waschke, 2014). Doch auch die sogenannte arrhythmogene Kardiomyopathie, Infektionserkrankungen wie das SSSS (engl. staphylococcal scalded skin syndrom) oder verschiedenste Krebsentitäten konnten in den letzten Jahren mit gestörter desmosomaler Adhäsion in Verbindung gebracht und so dem grundlegenden Verständnis dieser schweren und bis dato zum Teil unheilbaren Erkrankungen näher gekommen werden (Huber and Petersen, 2015, Delmar and McKenna, 2010, Amagai et al., 2000).

1.3.2 Desmosomen und die Pathogenese und Progression maligner Neoplasien

Wie oben bereits erwähnt, kann eine Störung von desmosomalen Strukturen und Funktionen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Progression maligner epithelialer Neoplasien spielen. Besonders die sogenannten „hallmarks of cancer“ (= Meilensteine in Krebserkrankungen) konnten in den letzten beiden Jahrzehnten verstärkt mit gestörter desmosomaler Adhäsion in Verbindung gebracht werden (Huber and Petersen, 2015, Celentano et al., 2017). Zu diesen Meilensteinen der Entwicklung eines malignen Tumors zählen je nach Definition sechs bis acht verschiedene biologische Fähigkeiten. Neben der Resistenz gegenüber Apoptose und anhaltender deregulierter Proliferation gehört hierzu auch die Aktivierung der Invasion und Metastasierung (Hanahan and Weinberg, 2011). Als Grundvoraussetzungen für Invasion und Metastasierung werden der Verlust von Zellhaftung, das Verlassen des organisierten Zellverbands, sowie das Ausbilden eines mesenchymalen Phänotyps angesehen (Stahley and Kowalczyk, 2015, Tselepis et al., 1998, Zetter, 1993). Dieser Wechsel des Phänotyps ist auch als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bekannt (Birchmeier et al., 1996). Tatsächlich konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass nahezu alle desmosomalen Komponenten in verschiedensten Krebsentitäten dereguliert sind (Stahley and Kowalczyk, 2015), wobei sowohl eine Hochregulation (Aceto et al., 2014, Brennan and Mahoney, 2009, Breuninger et al., 2010, Chen et al., 2013, Demirag et al., 2012) als auch eine Herunterregulation (Wang et al., 2014, Wong et al., 2008, Schule et al., 2014, Barber et al., 2014, Chen et al., 2012) mit erhöhter Malignität oder schlechterer Prognose assoziiert sein kann. Dies macht eine Interpretation der generellen Rolle desmosomaler Proteine (speziell der Desmocadherine) in Bezug auf die Malignität epithelialer Neoplasien schwierig (Celentano et al., 2017). Letztendlich muss davon ausgegangen werden, dass die Rolle der Desmosomen zwischen verschiedenen Krebsentitäten variiert. Für die finale Beurteilung des kanzerogenen Potenzials desmosomaler Komponenten ist daher eine differenzierte Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen für die jeweilige spezifische Krebsentität essenziell.

Beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas gibt es bislang relativ wenige Erkenntnisse, ob und wie Desmosomen und ihre Komponenten die Malignität dieser speziellen Krebsentität beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass eine

Verringerung von DSC2 mit einer schlechteren Prognose des Pankreaskarzinoms assoziiert ist (Hamidov et al., 2011). Weiter konnten hohe Expressionslevel von DSG3, welches in einschichtigem Epithel typischerweise nicht oder nur in sehr geringem Maße vorkommt, mit einer signifikant verschlechterten Prognose in Verbindung gebracht werden (Ormanns et al., 2015). In Kontrast dazu wurde 2008 beschrieben, dass die Expression von DSG2 in PDAC über den verstärkten Abbau durch die Serin-Protease Kallikrein 7 verringert ist (Ramani et al., 2008).

Diese teils vielversprechenden, teils kontroversen Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer detaillierteren Erforschung der Rolle der verschiedenen desmosomalen Komponenten für die Malignität des Pankreaskarzinoms.

1.4 Fragestellung

Die Kombination aus später Diagnose, früher Metastasierung und sehr limitierter systemischer Therapierbarkeit macht das Pankreaskarzinom zur tödlichsten Krebserkrankung in der westlichen Welt (Siegel et al., 2018).

Die grundlegenden molekularen Mechanismen von Invasion und Metastasierung sind bis heute nicht hinreichend geklärt (Sleeman et al., 2012). Eine hochfavorisierte, jedoch nicht unumstrittene Theorie ist die der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), welche als grundlegenden Schritt den Abbau adhäsiver Strukturen (inkl. Desmosomen) beinhaltet.

Sollte diese Theorie für das Pankreaskarzinom zutreffen, ist zu erwarten, dass ein Verlust von Zelladhäsion, bzw. von Adhäsionsproteinen die Metastasierungsrate von Pankreaskarzinom-Zellen steigert. Da die Metastasierung für die Prognose und den Verlauf des Pankreaskarzinoms von entscheidender Bedeutung ist, wäre eine systemische Therapie zur Metastasierungsprävention von hoher klinischer Relevanz. Desmosomen, die als die wichtigsten Haftkontakte für die interzelluläre Adhäsion in epithelialen Geweben angesehen werden (Waschke, 2008, Dubash and Green, 2011), sind hierbei ein vielversprechender molekularbiologischer Ansatzpunkt. Desmoglein 2 und Desmocollin 2 sind die in pankreatischem Gewebe vorherrschenden desmosomalen Cadherine und unabdingbar für die Integrität von Desmosomen. Besonders Desmoglein 2 ist essenziell für die interzelluläre Adhäsion in Pankreaskarzinom-Zellen (Hütz et al., 2017), wenn auch in Bezug auf diese Krebsentität schlecht erforscht.

Daraus ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgenden Zielsetzungen:

Erstens sollen mittels der CRISPR/Cas9-Methode Knockout-Zelllinien aus einer parenteralen Pankreaskarzinom-Zelllinie hergestellt werden. Zweitens soll parallel in einer bereits bestehenden Pankreaskarzinom-Zelllinie mit durch shRNA reduzierter DSG2-Expression der Einfluss eines DSG2-Verlusts auf die Malignität mittels verschiedener phänotypischer Assays überprüft werden. Es sollen nach Möglichkeit DSG2-abhängige Signalwegsveränderungen identifiziert werden, welche mit klassischen tumorigenen Signalwegen interferieren. Drittens sollen Möglichkeiten zu einer Verringerung der Malignität über eine Stärkung der Zelladhäsion evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Es wurden verschiedene humane Pankreaskarzinom-Zelllinien kultiviert. Diese sind in die jeweiligen Wildtyp-Zelllinien und gentechnisch modifizierte Zellklone zu unterscheiden, die allesamt ausgehend von der AsPC-1-Zelllinie generiert wurden. Es wurde mit folgenden Wildtyp-Zelllinien gearbeitet: AsPC-1, Capan-2, IMIM-PC-1, PANC-1. Die für weiterführende Experimente standardmäßig verwendeten gentechnisch modifizierten Zellklone sind in Tabelle 1 fett gedruckt. Sollte für das jeweilige Experiment keine spezifische Klonnummer angegeben sein, wurden diese Standardklone verwendet.

Tabelle 1: Verwendete gentechnisch modifizierte Zellklone

AsPC-1 shRNA DSG2-Knockdown	AsPC-1 CRISPR/Cas9 DSG2-Knockout
shDSG2 Klon 3	DSG2 KO Klon 7-F11
shDSG2 Klon 4	DSG2 KO Klon 7-G5
shDSG2 Klon 5	DSG2 KO Klon 8-E5
shDSG2 Klon 14	DSG2 Ctrl Klon 8-D7
shDSG2 Klon 18	DSG2 Ctrl Klon 9-C7
shNT Klon 8	DSG2 Ctrl Klon 10-E4

2.1.1 Wildtyp-Zelllinien

Alle in Kapitel 2.1 genannten Wildtyp-Zelllinien sind humane Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinien. Diese wurden aus verschiedenen Patienten unterschiedlicher Tumorstadien auf unterschiedliche Art und Weise gewonnen. AsPC-1-Zellen wurden 1982 aus dem Aszites einer 62-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes isoliert (Chen et al., 1982). Capan-2 und PANC-1 entstammen beide jeweils einem Pankreatektomie-Resektat eines 56-jährigen männlichen Patienten (Deer et al., 2010) und IMIM-PC-1 aus einer Lebermetastase eines männlichen Patienten (Vila et al., 1995).

AsPC-1-Zellen wurden in T75-Flaschen mit RPMI-1640-Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) kultiviert. Dem Medium wurde 10 % fetales Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin (beide AppliChem, Darmstadt) zugemischt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 100 % Luftfeuchte inkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90 % des Zellrasens (i.d.R. nach 3-4 Tagen) wurden die Zellen in neue T75-Flaschen passagiert. Für die Passagierung wurden die Zellen kurz mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, siehe Tabelle 6) gewaschen und daraufhin 10 min mit Trypsinlösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen des Zellrasens und die Vereinzelung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald sich die Zellen suffizient von Boden der Flasche abgelöst hatten, wurden sie in Medium resuspendiert, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in einem Verhältnis von 1:2-1:3 in neue Flaschen überführt, bzw. für Versuche auf unbehandelte Deckgläser oder in Wellplatten ausgesät.

Capan-2, IMIM-PC-1 und PANC-1 wurden analog zu AsPC-1-Zellen in T75-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Für diese drei Zelllinien wurde jedoch statt RPMI-1640-Medium Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Zu DMEM wurde gleichermaßen 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin zugemischt. Für die Passagierung wurden die Zelllinien IMIM-PC-1 und PANC-1 nach kurzem Waschen mit PBS 3 min mit Trypsinlösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) bei 37 °C inkubiert. Beide Zelllinien wurden in einem Verhältnis von ca. 1:10 auf neue T75-Flaschen aufgeteilt, bzw. für Versuche ausgesät. Capan-2 Zellen wurden zur Passagierung mit einer EDTA-Lösung (0,05 % EDTA in PBS) für 10 min bei 37 °C vorinkubiert und im Folgenden mit oben genannter Trypsinlösung (10 min bei 37 °C) vom Flaschenboden abgelöst. Durch die Ca²⁺-Chelatkomplexierung mittels EDTA-Lösung wird die Ca²⁺-abhängige Cadherinbindung gestört und die Zellvereinzelung erleichtert. Das Passagieverhältnis betrug bei Capan-2 Zellen je nach Konfluenz und Zellzahl 1:2-1:4.

2.1.2 *shRNA DSG2-Knockdown Zellklone*

Die in Tabelle 1 genannten AsPC-1 shRNA DSG2-Knockdown Zellklone waren bereits vor Beginn des in dieser Dissertation beschriebenen Projekts in der

Arbeitsgruppe etabliert (Hütz et al., 2017). Im Folgenden werden kurz deren Eigenschaften und Kulturbedingungen dargelegt:

Für die Herstellung der DSG2-Knockdown Zellen und deren korrespondierender Kontrollzelllinie wurde der pLKO.1-TCR Klonierungsvektor (Addgene, Cambridge, MA, USA) verwendet. In diesen wurde für den Knockdown ein 21 bp Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zum *DSG2*-Gen (Seq.: GCACATACTCTTGTGATG AAA) ligiert. Für die Kontrollzelllinie wurde ein Non-target (NT) Oligonukleotid verwendet, welches keine bekannten komplementären Sequenzen zum *DSG2*-Gen aufweist. Nach Generierung der jeweiligen Konstrukte und Transfektion durch Lipofektion in AsPC-1 Zellen wurden die transfizierten Zellen durch Zugabe von Puromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in einer Konzentration von 3,5 µg/ml Medium auf positive Zellklone selektioniert und über die komplette Dauer der Zellkultur unter diesem Selektionsdruck gehalten. Abgesehen vom Zusatz von Puromycin wurden alle shDSG2 und shNT Klone unter analogen Bedingungen zu AsPC-1 Zellen gehalten (siehe 2.1.1).

2.1.3 Generierung von *DSG2*-Knockout-Zellklonen mittels CRISPR/Cas9

In den folgenden Kapiteln wird schrittweise beschrieben, wie die in Tabelle 1 genannten AsPC-1 CRISPR/Cas9 *DSG2*-Knockout Klone generiert wurden.

2.1.3.1 Einführung CRISPR/Cas

Das „CRISPR/Cas gene editing“ Verfahren ist eine relativ neue Methode der Gentechnik. Sie wurde seit der Mitte der 2000er Jahre durch verschiedene Arbeitsgruppen entwickelt. Erstmals wurden sogenannte CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) jedoch bereits 1987 durch eine japanische Arbeitsgruppe beschrieben (Ishino et al., 1987), auch wenn die in *E. coli* identifizierten charakteristischen Wiederholungen bestimmter Sequenzen noch nicht als CRISPR bezeichnet wurden. Dieser Term wurde erstmals von Ruud Jansen im Jahr 2002 verwendet (Jansen et al., 2002). In den folgenden Jahren intensivierte sich die Forschung an CRISPR und deren Funktion. Die Hypothese entstand, dass es sich dabei zusammen mit den CRISPR assoziierten Genen (= CRISPR associated, Cas), welche unter anderem für Nukleasen codieren (Haft et al., 2005), um eine Form bakteriologischer Immunität handeln könnte (Makarova et al., 2006). Dies wurde 2007 bestätigt. CRISPR/Cas Komplexe besitzen die Fähigkeit durch Bakteriophagen in die Zelle eingeschleuste DNA zu schneiden und

sie dadurch zu inaktivieren (Barrangou et al., 2007). Das Potenzial DNA spezifisch zu schneiden, wurde sehr bald als Möglichkeit für eine biotechnologische Methode erkannt und die natürlich vorkommenden CRISPR/Cas-Komplexe soweit adaptiert, dass sie für das spezifische Schneiden von DNA in Experimenten eingesetzt werden konnten. Die heutzutage biotechnologisch am häufigsten eingesetzte CRISPR-assoziierte Endonuklease ist die Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014), die auch für die Generierung der AsPC-1 CRISPR/Cas9 DSG2-Knockout Zellen benutzt wurde. Vereinfacht bestehen diese CRISPR/Cas9-Komplexe aus einer sogenannten single guide-RNA (sgRNA oder gRNA) und der Cas9-Endonuklease. Die gRNA enthält unter anderem eine 20 bp lange zur Zielsequenz im Gen komplementäre Sequenz. Die Aufgabe der gRNA ist es, die Bindung des CRISPR/Cas9-Komplexes an die Ziel-DNA zu vermitteln, welche dann von der Cas9-Endonuklease geschnitten wird. Letztendlich entsteht, durch zwei unterschiedliche Domänen der Cas9 vermittelt, innerhalb der Target-Site ein Doppelstrangbruch. Diesen versucht die Zelle entweder durch nicht homologe Endverknüpfung oder homologe Rekombination zu reparieren und die ursprüngliche Sequenz wiederherzustellen. Da die homologe Rekombination auf die späte S-Phase und G2-Phase limitiert ist, findet hauptsächlich nicht homologe Endverknüpfung statt, welche stark fehlerbehaftet ist (Graw, 2015). Diese Tatsache macht man sich beim Erzeugen von CRISPR/Cas9 vermittelten Knockouts zunutze. Zusammengefasst versucht man durch den Doppelstrangbruch an einer klar definierten Stelle und die konsekutive fehlerhafte Reparatur eine möglichst kleine Mutation zu erzeugen, welche dann durch eine Leserasterverschiebung z.B. zu einem Stopcodon und zum Verlust bzw. der Funktionsuntüchtigkeit des jeweiligen Proteins führt.

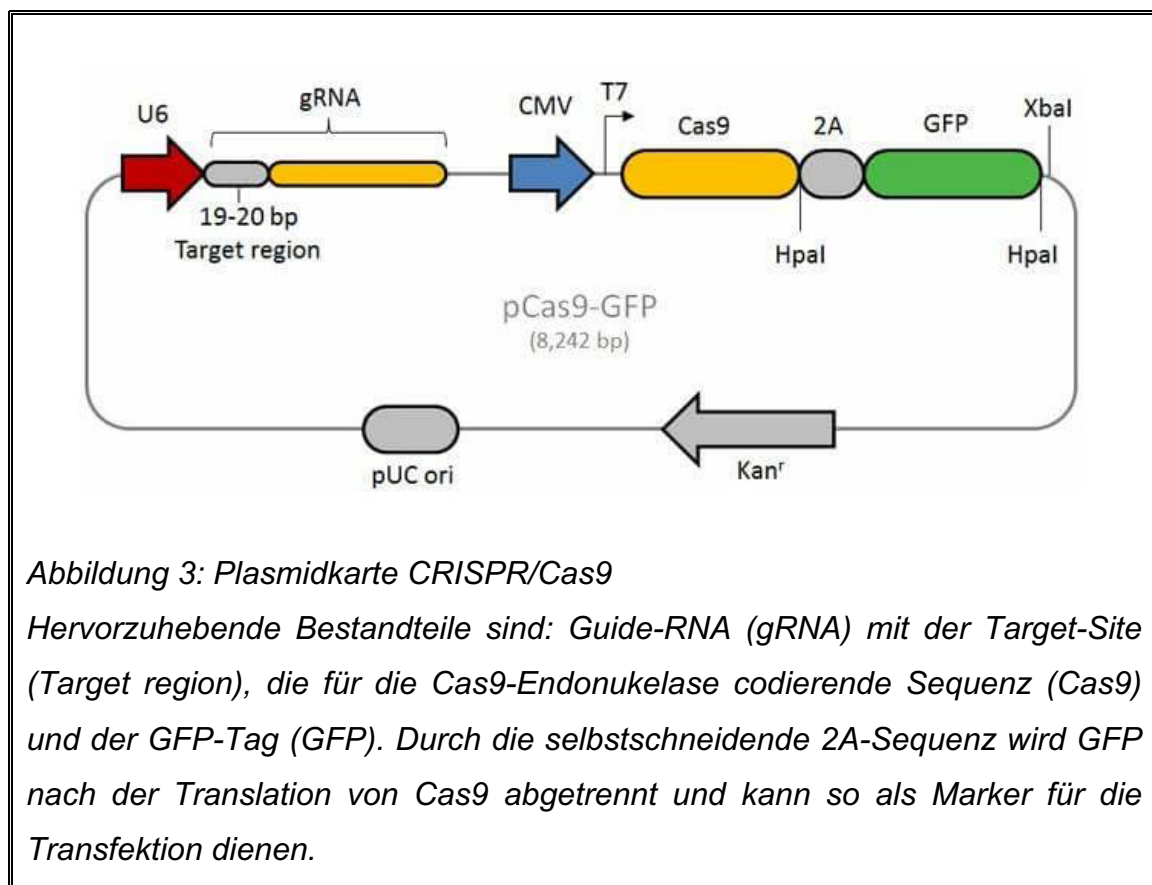
2.1.3.2 Verwendete CRISPR/Cas9-Plasmide

Die beiden im Folgenden beschriebenen CRISPR/Cas9-Plasmide wurden mithilfe des Online-Design-Tools der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) generiert und dort bestellt. Nach Empfehlungen des Anbieters wurden zwei Target-Sites gewählt, die möglichst proximal im *DSG2*-Gen angreifen, da dadurch das resultierende Proteinfragment möglichst klein und ein vollständiger Funktionsverlust wahrscheinlicher ist. Aus den 38 verfügbaren Target-Sites wurde jeweils eine zu einem DNA-Abschnitt in Exon 3 und eine in Exon 5 komplementäre Sequenz gewählt.

Tabelle 2: Verwendete CRISPR/Cas9-Plasmide

Bezeichnung	Exon	Target-Site
CRISPR/Cas9-Plasmid-1	3	GCTTTTGCCGCACTAAATGAGG
CRISPR/Cas9-Plasmid-2	5	GTTACGCTTTGGATGCAAGAGG

Die Plasmide unterscheiden sich demnach am Angriffsort innerhalb des *DSG2*-Gens, jedoch nicht in deren genereller Struktur (siehe Abbildung 3).



2.1.3.3 Transformation und Isolation der Plasmide

Der erste Schritt zu CRISPR/Cas9-Knockout Zellen bestand in der Vermehrung der Plasmide mittels Transformation in *E.coli*-DH5 α -Zellen und deren Isolation und Aufreinigung. Im Folgenden wird die Durchführung der Transformation exemplarisch für ein CRISPR/Cas9-Plasmid beschrieben.

100 μ l kompetenter DH5 α -Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden 20 μ l KCM-Puffer (siehe Tabelle 6), 77 μ l destilliertes Wasser und 3 μ l Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt. Dieses sollte mindestens über 5 min abkühlen. Im Anschluss wurde dieses Gemisch zu

den DH5 α -Zellen pipettiert und für 20 min auf Eis, dann für 10 min bei Raumtemperatur und weitere 5 min auf Eis gelagert. Weiter wurde dem Gemisch aus Puffer und Zellen 1 ml LB-Medium (siehe Tabelle 6) zugegeben und bei 37 °C für 1 h geschüttelt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß für 3 min bei 6000 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Hamburg). 1 ml des Überstands wurde verworfen und das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wurde komplett auf einer LB-Agarplatte mit 50 μ g/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Wachstum kontrolliert und ein Klon gepickt. Mit der verwendeten Öse wurden daraufhin 150 ml LB-Medium (+50 μ g/ml Kanamycin) angeimpft und bei 37 °C erneut über Nacht in einem Schüttelinkubator (WiseCube WIS-30, Witeg Labortechnik, Wertheim) bei 150 rpm inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA aus oben beschriebener Übernachtskultur mittels des NucleoBond® Xtra Midi Kits (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in sterilem H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.1.3.4 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Für die erfolgreiche Transfektion der AsPC-1 Zellen war eine exakte Bestimmung der Konzentration der in der Transformation gewonnen Plasmide essentiell. Für die photometrische Messung wurde eine Nanoquant-Platte und der Mikroplattenleser Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) verwendet. Dabei wurden die in 2.1.3.3 extrahierten Plasmide zunächst 1:10 in sterilem H₂O verdünnt und davon 2 μ l auf die Nanoquant-Platte pipettiert. Um eine exakte Bestimmung zu gewährleisten, wurde jedes Plasmid dreifach aufgetragen. Die photometrische Messung basiert auf der Extinktion von UV-Licht durch DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte (OD) von OD = 1 entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml (Mühlhardt, 2013). Um die Reinheit der Probe zu bestimmen, wurde der Quotient aus der OD bei 260 nm (OD₂₆₀) und 280 nm (OD₂₈₀) gebildet. OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte in einer proteinfreien Lösung 1,8-2,0 betragen (Mühlhardt, 2013).

2.1.3.5 Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese

Um sicher gehen zu können, dass es sich bei dem in 2.1.3.3 isolierten Plasmiden um die gewünschten CRISPR/Cas9-Plasmide handelt, wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, enthalten die CRISPR/Cas9-Plasmide eine Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI (in der Abbildung markiert mit „XbaI“). Das Auftrennen des Doppelstranges führt dazu, dass die ringförmige Plasmid-DNA als lineare DNA vorliegt. Die Größe der linearisierten Plasmid-DNA kann daraufhin in einer Agarose-Gelelektrophorese ermittelt werden und mit der bekannten Größe des gewünschten Plasmids verglichen werden.

Konkret wurden für den Restriktionsverdau folgende Schritte durchgeführt: Zunächst wurden je Plasmid 2 µl 10x Tango-Puffer, 1 µl XbaI-Enzym (beide Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 1 µl Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß gemischt. Weiter wurden 16 µl steriles H₂O zugegeben und der Reaktionsansatz bei 37 °C für 3 h inkubiert.

Die verdaute Plasmid-DNA wurde danach zusammen mit dem jeweiligen korrespondierenden unverdauten Plasmid als Kontrolle auf ein 1 % Agarosegel in 1x TAE-Puffer (siehe Tabelle 6) aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 4 µl 6x DNA-Ladepuffer (Life Technologies, Carlsbad, USA) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet und für die Elektrophorese eine Spannung von 100 V angelegt. Zur Größenbestimmung wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und die DNA-Banden durch UV-induzierte Fluoreszenz sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gerät FluorChemE (ProteinSimple, Kalifornien, USA) genutzt.

2.1.3.6 Transfektion

Für die Transfektion wurden die Zellen in einer Zellzahl von 10⁶ Zellen pro Well in eine 6-Wellplatte ausgesät. Insgesamt wurden vier Wells befüllt. Je zwei dieser Wells wurden für die Transfektion mit jeweils einer der beiden CRISPR/Cas9-Konstrukte benutzt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % gehalten und mittels Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Darmstadt) transfiziert. Es wurden pro Well 4 µg Plasmid-DNA verwendet. Davon abgesehen wurden alle weiteren Schritte und Testreagenzien nach den Empfehlungen des Herstellers

(Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt, bzw. verwendet. Sowohl das Wachstum als auch die Transfektionseffizienz wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Für die Transfektionseffizienz wurden die an das CRISPR/Cas9-Plasmid gekoppelten GFP Moleküle mittels Lichts einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt und die Emission in einem Spektrum von 500-550 nm unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Das CRISPR/Cas9-Plasmid enthaltende Zellen zeigten ein deutliches grünes Fluoreszenzsignal.

2.1.3.7 Zellvereinzelung

Zur Vorbereitung für die Zellvereinzelung wurden zehn 96-Wellplatten mit jeweils 50 µl Medium befüllt. Das verwendete Medium bestand zu 25 % aus konditioniertem Medium (= Überstand der AsPC-1-Zellkultur nach 72h Wachstum). Diese Konzentration wurde in einem Vorversuch ermittelt, bei dem das Wachstum vereinzelter AsPC-1-Zellen in Abhängigkeit von der Zugabe von konditioniertem Medium unterschiedlicher Konzentration beobachtet wurde. Eine Zugabe von 25 % konditioniertem Medium zeigte hierbei die besten Resultate. Ansonsten wurden dem RPMI 1640 Medium die üblichen Zusätze in den unter 2.1.1 genannten Konzentrationen zugemischt.

Nach einer Wachstumsperiode von 48 h nach Transfektion wurden die Zellen nach dem üblichen Protokoll der Passagierung von AsPC-1 Zellen (siehe 2.1.1) gewaschen, trypsinisiert und in Medium resuspendiert. Mit dem selben CRISPR/Cas9-Plasmid transfizierte Wells wurden in diesem Schritt gepoolt. Die jeweilige Medium-Zellsuspension wurde anschließend bei 300 g für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 °C kaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis in die „Cell Sorting Core Facility“ des Klinikums der Universität München transportiert und dort mittels eines FACSAria III (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) Durchflusszytometers vereinzelt. Die Zellvereinzelung erfolgte nach Größe der Zellen und Intensität der GFP-Fluoreszenz. So wurden Dubletten und andere Zellkonglomerate sowie nicht transfizierte Zellen zuverlässig ausgeschlossen. Daraufhin wurde in jedes Well der zehn 96-Wellplatten eine Zelle pipettiert. Jeweils 5 Platten wurden mit CRISPR/Cas9-Plasmid-1 und 5 Platten mit CRISPR/Cas9-Plasmid-2 transfizierten Zellen befüllt. Nach der Einzelzellsortierung wurden alle Wells mit 25 % konditioniertem Medium zu einem Volumen von 200 µl aufgefüllt und im Inkubationsschrank (37 °C, 5 % CO₂) gehalten.

2.1.3.8 Kulturbedingungen

Nach der Zellvereinzelung wurden die Zellen für eine Woche alle zwei Tage kurz makroskopisch kontrolliert. Wichtig war hierbei sicherzustellen, dass alle Wells mit ausreichend Medium befüllt sind, da dieses über die Zeit langsam verdunstet. Ansonsten sollten die Zellen in dieser Phase möglichst störungsfrei gehalten werden, um ein optimales Anwachsen und Vermehren der Einzelzellklone zu ermöglichen. Ab dem 8. Tag nach Vereinzelung wurden alle Wells täglich mikroskopisch kontrolliert und das Wachstum sowie der Zustand der Zellen und des Mediums dokumentiert. Für alle folgenden Medienwechsel oder -zugaben wurde unkonditioniertes RPMI 1640 Medium mit den Standardzusätzen verwendet. Bei größeren Zellkolonien wurden bis zum Erreichen von Konfluenz je nach Farbe des Mediums Medienwechsel durchgeführt. Im Durchschnitt war dies alle 3-4 Tage nötig. Zusätzlich wurde in allen anderen Wells mit positivem Wachstum und geringem Verbrauch von Medium darauf geachtet, dass dieses stets in ausreichendem Volumen (ca. 200 µl) vorhanden war. Bei Erreichen von Konfluenz, bzw. stagnierendem Flächenwachstum einer großen Kolonie, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 30 µl Trypsin vom Untergrund abgelöst, in Medium resuspendiert und in das nächstgrößere Kulturgefäß überführt. Die Reihenfolge der Kulturgefäße war wie folgt: 96-/24-/6-Wellplatte, T25-Flasche und T75-Flasche. Da im ursprünglichen Kulturgefäß bei der Passagierung immer einige Zellen verbleiben, wurde dieses wieder mit Medium befüllt und als Reserve genutzt. Insgesamt erreichten 21 Klone das 6-Well Stadium und wurden auf einen Knockout untersucht (siehe 2.1.3.9). Alle anderen Klone (max. Anzahl: 34) konnten innerhalb von 6 Wochen nach Zellvereinzelung nicht so weit passagiert werden, dass eine Aufzucht zu einer langfristig kultivierbaren Zelllinie sinnvoll erschien. Die getesteten Klone wurden, sobald sie das T-75 Stadium erreicht hatten, in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.3.9 Screening auf DSG2-Knockouts

Für ein möglichst effizientes Screening auf DSG2-Knockouts wurde Western-blotting als Methode gewählt (detaillierte Beschreibung der Methode siehe 2.2). Die Zellen wurden mit SDS-Lysepuffer (siehe Tabelle 6) lysiert, sobald sie Konfluenz in einem Well einer 24-Wellplatte erreicht hatten und mindestens zwei weitere Kulturgefäße dieses Klons vorhanden waren. Jeweils sieben Lysate

unterschiedlicher Klone wurden gesammelt und daraufhin eine SDS-PAGE (siehe 2.2.3) und ein Western-Blot durchgeführt.

2.1.3.10 DNA-Extraktion und Sequenzierung

Um die im Screening mittels Western-Blot detektierten DSG2-Knockouts zweifelsfrei nachzuweisen, wurde eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Hierdurch können etwaige Mutationen und deren Auswirkungen direkt identifiziert werden. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde der Firma die genaue Target-Site des jeweiligen CRISPR/Cas9-Konstrukts mitgeteilt und um eine großzügige Sequenzierung von 500-700 bp um die Target-Site herum gebeten. Insgesamt wurden der Firma sieben verschiedene Proben zugesandt. Sechs davon enthielten DNA, welche aus mit CRISPR/Cas9 transfizierten Klonen isoliert worden war und eine Probe enthielt DNA des AsPC-1 Wildtyps. Unter den Proben der Klone befanden sich drei im Western-Blot identifizierte DSG2-Knockouts und drei Klone, welche dem Wildtyp ähnliche DSG2-Banden zeigten. Als Material wurde der Firma genomische DNA, welche mittels Chloroform-Phenol-Extraktion gewonnen wurde, zur Verfügung gestellt.

Die DNA-Extraktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Zunächst wurden Zellen eines jeden zu analysierenden Klons in einer 6-Wellplatte in einer Zahl von 10^6 pro Well und Klon ausgesät. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen nach Standardprotokoll (siehe 2.1.1) gewaschen, trypsinisiert, resuspendiert und die resultierende Zellsuspension bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Phenol/Chloroform (1:1) (beide Carl Roth, Karlsruhe) aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde kräftig geschüttelt bis sich eine Emulsion bildete (ca. 20-30 s). Diese wurde daraufhin für 3 min bei 300 g zentrifugiert, um die organische und aquatische Phase voneinander zu trennen. Da sich DNA in der aquatischen Phase löst, wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase, sowie die proteinhaltige Interphase verworfen. Die Schritte ab der Zugabe von Chloroform/Phenol wurden so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Die Interphase zeigt sich typischerweise als proteinhaltige milchig-trübe Schicht unterhalb der aquatischen und oberhalb der organischen Phase. Zuletzt wurden der isolierten aquatischen Phase 500 µl Chloroform zugegeben und erneut wie oben

beschrieben geschüttelt, zentrifugiert und abpipettiert. Weiter wurde eine Alkoholfällung durchgeführt, um die DNA zu fällen, von Chloroform zu reinigen und in Wasser überführen zu können. Dabei wurden dem Reaktionsgefäß zunächst 50 µl 3 M Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) und 25 µl 2 M Magnesiumchlorid (MgCl_2) zugefügt, sowie 1,5 ml 100 %iger Ethanol einer Temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach invertiert und für 2 h bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach wurde es für 30 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit (19090 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 95 %igem Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen (mehrfaches Invertieren). Erneut wurde bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min bei 19090 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Im Anschluss wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und nach vollständigem Verflüchtigen des Ethanols in 50 µl sterilem H_2O resuspendiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Abholung durch die Firma Eurofins gelagert.

2.2 Quantitative Protein-Immunodetektion (Westernblotting)

In diesem Kapitel wird die quantitative Detektion von spezifischen Proteinen in einem Zelllysate beschrieben (Western-Blot). Dies inkludiert alle vorangehenden Schritte, wie die Herstellung der Lysate, die Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat und das Auftrennen der Proteine nach deren Größe mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Für alle Westernblotting-Versuche wurden Zelllysate mittels eines Natriumdodecylsulfat-haltigen Puffers hergestellt (SDS-Lysepuffer, siehe Tabelle 6). Dem SDS-Lysepuffer wurde vor der Zellyse im Verhältnis 1:1 2-fach-Proteaseinhibitor (complete ultra tablets, Roche, Basel, Schweiz) zugefügt. Zur Zellyse wurden die in 24-Wellplatten ausgesäten Zellen mit PBS von jeglichen Mediumsresten befreit und mit 60 µl SDS-Lysepuffer/Proteaseinhibitor versetzt. Die Zellen wurden mit einer Pipettenspitze vom Boden des Wells abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um das entstandene stark visköse Zelllysate zu verflüssigen und die Zellen vollständig aufzuschließen wurden die Lysate mit einem Ultraschall-Gerät (Sonifier 250, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) homogenisiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der in den SDS-Zelllysaten enthaltenen Proteinmenge wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der quantitative Proteinnachweis mit genanntem Kit beruht auf der Biuretreaktion und einer Komplexbildung der Proteine mit Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid, BCA). Die entstehenden Chelatkomplexe besitzen ein Absorptionsmaximum bei 562 nm (Smith et al., 1985). Durch den Vergleich zu einer BSA-Standardgerade (Bovines Serum Albumin) mit bekannten Konzentrationen kann die in den Proben enthaltene Proteinmenge photometrisch bestimmt werden. Konkret wurden den jeweiligen SDS-Zelllysaten (1:5 in SDS-Lysepuffer/Proteaseinhibitor verdünnt) in einer 96-Wellplatte 200 µl der vorher vorbereiteten Reaktionslösung des Kits zugegeben und die Wellplatte bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben im Dunkeln bei RT (ca. 20 min) wurden die jeweiligen Absorptionswerte mit dem Mikroplattenleser Infinite 200 bestimmt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um spezifische Proteine in einem Western-Blot detektieren zu können, müssen diese zuvor nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dies geschieht mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Diese Methode basiert auf der elektrophoretischen Proteinauftrennung nach Laemmli (Laemmli, 1970). Hierzu wurden die Proben vor der Elektrophorese 1:3 mit Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 6) gemischt und für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert. Anschließend wurden standardmäßig 7,5 µg Protein pro Probe in die Taschen eines 5 %igen SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Dieses Gel diente als Sammelgel. An das Sammelgel anschließend wurden die Proben in einem 10 %igen Polyacrylamidgel bei einer Spannung von 120 V in einer mit Laufpuffer (siehe Tabelle 6) gefüllten Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories, München) nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch das Detergenz SDS und die Denaturierung bei 95 °C liegen die Proteine während der Auftrennung in ihrer einheitlich negativ geladenen Primärstruktur vor und die Laufgeschwindigkeit im Gel wird alleine durch die Größe des Proteins determiniert (Laemmli, 1970). Als Größenstandard wurde PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel direkt im nächsten Schritt (siehe 2.2.4) weiterverarbeitet.

2.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Direkt nach der Elektrophorese wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine für die Detektion auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham-Biosciences, Freiburg) übertragen. Hierzu wurde das Gel und die Membran flankiert von jeweils zwei Filterpapieren in eine mit 1x Transferpuffer (siehe Tabelle 6) gefüllte Mini Trans-Blot®-Kammer (Bio-Rad) eingespannt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Membran verblieben. Bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA wurden die Proteine über 1,5 h auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Absättigung freier Protein-Bindungsstellen wurde die Membran bei Raumtemperatur für 1 h mit 5 % BSA in TBST (Tabelle 6) inkubiert (Blocken). Nach dem Blocken wurde die Membran mit dem für das jeweilige zu detektierende Protein spezifischen Primärantikörper für ca. 16 h (je nach Antikörper aber in jedem Fall > 8 h) bei 4 °C auf einer rotierenden Platte (Rotator Genie, Scientific Industries, New York, USA) inkubiert. Daraufgehend wurde nicht gebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 5 min in TBST wieder entfernt. Dieser Schritt ist entscheidend, um störende Hintergrundsignale zu verringern. Anschließend wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper behandelt. Dieser ist gegen die F_c-Domäne des verwendeten Primärantikörpers gerichtet und wurde standardmäßig 1:10000 in TBST verdünnt.

Um die gesuchten Protein-Banden visualisieren zu können, muss die Membran mit einer Entwicklerlösung behandelt werden. Dies geschah nach der ECL-Methode (engl. enhanced chemiluminescence) (Whitehead et al., 1979). Hierbei werden die beiden frisch hergestellten (Haltbarkeit ca. 3 d) Lösungen ECL I und ECL II (siehe Tabelle 6) im Verhältnis von 1:1 gemischt und die Membran darin für 1 min geschwenkt. Gebundene Sekundärantikörper (Antigen-Primärantikörper-Sekundärantikörper-Komplexe) katalysieren durch die aktive Peroxidase hierbei die Reaktion von Luminol zu lichtemittierendem Carbonyl. Diese Lichtemission wurde mit dem Gerät FluorChem E (ProteinSimple, San Jose, USA) digital aufgenommen. Sollten auf derselben Membran nach bereits erfolgter Antikörperinkubation weitere Proteine gleichen oder sehr ähnlichen Molekulargewichts detektiert werden, musste die Stripping-Methode angewendet werden. Mit dieser werden alle nach der Entwicklung noch gebundenen

Primärantikörper durch das Inkubieren der Membran in Strippingpuffer (siehe Tabelle 6) für 25 min bei 70 °C entfernt. Danach musste die Membran erneut wie oben beschrieben geblockt werden.

2.3 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Diese Methode wurde verwendet, um die morphologische Proteinverteilung in den Pankreaskarzinom-Zellen zu untersuchen. Hierbei wurden die Zellen mit einem Primärantikörper behandelt, dessen F_{ab} -Teil an die Epitope der jeweils zu untersuchenden Proteine bindet. Diese Bindung wurde mittels eines Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpers (gegen F_C -Domäne des Primärantikörpers gerichtet) durch Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge und der resultierenden Emission des Fluorophors sichtbar gemacht. Alle Aufnahmen wurden mit einem TCS SP5-Konfokalmikroskop der Firma Leica, Mannheim angefertigt.

Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen in einer Zahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 24-Wellplatte auf unbehandelte Glas-Deckgläschen (Durchmesser: 12 mm) ausgesät und bis zur Konfluenz gehalten. Nach Erreichen dieser wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und für 10 min mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Daraufhin wurde dreimal mit PBS für 5 min gewaschen und anschließend mit 0,1 % Triton-X-100 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in PBS für 5 min permeabilisiert. Erneut wurde wie oben dreimal mit PBS gewaschen. Für die weitere Bearbeitung wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt und, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen, für 1 h bei Raumtemperatur mit BSA/NGS (Bovines Serum Albumin/Normal Goat Serum) inkubiert. Danach wurde das BSA/NGS vorsichtig mit einem Stück Zellstoff abgesaugt und 30 μ l Primärantikörper auf die Deckgläschen pipettiert. Die folgende Inkubation wurde in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde abermals dreimal mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Bevor der Sekundärantikörper zugegeben werden konnte, mussten die Deckgläschen auf Zellstoff vorsichtig abgetupft werden, um möglichst viel verbleibendes PBS zu entfernen. Vom Sekundärantikörper wurde ebenfalls ein Volumen von 30 μ l verwendet und erneut in der Feuchtkammer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit PBS gewaschen, der Objektträger gut getrocknet und das Deckgläschen kurz in destilliertes H_2O getaucht, um eventuell

auskristallisierende PBS-Reste zu entfernen. Nach erneutem Abtupfen des Deckgläschens wurde dieses mit dem Zellrasen nach unten auf einem vorher auf dem Objektträger platzierten Tropfen Eindeckmittel (ProLong® Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) platziert.

2.4 EdU-Proliferationsassay

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurde das Click iT® EdU Imaging Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieses Kit ermöglicht die fluoreszenzmarkierte Detektion proliferierender Zellen nach folgender Funktionsweise: In einem ersten Schritt werden die zu untersuchenden Zellen mit 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) inkubiert. Dieses wird von den Zellen hocheffektiv als Thymidin-Analogon in neu synthetisierte DNA integriert. Im nächsten Schritt wird EdU mittels einer Cu(I) katalysierten Cycloadditionsreaktion zwischen der terminalen Alkin-Gruppe des EdU und einem Fluorophor-gekoppelten Azid fluoreszenzmarkiert. Diese Reaktion wird auch als „Click-Reaktion“ bezeichnet (Kolb et al., 2001). Als Fluorophor wurde in diesem Fall Alexa488 verwendet. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die DNA nicht mehr denaturiert werden muss, wie dies in bis vor wenigen Jahren noch gängigen antikörpervermittelten Fluoreszenzmarkierungen der Fall war (Salic and Mitchison, 2008). Zudem ermöglicht die geringe Größe des Alexa488-Azids eine hohe Penetration der DNA und kann somit inkorporierte EdU-Moleküle zuverlässig nachweisen (Salic and Mitchison, 2008). Um ein Verhältnis zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen bilden zu können, wurden alle Zellkerne mittels dem in oben genannten Kit enthaltenen Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt.

Die Zellen wurden in 24-Wellplatten auf 12 mm Deckgläschen in einer Zahl von 10^5 Zellen pro Well ausgesät. Nach einer Wachstumsphase von 24 h wurden die Zellen für 1 h mit EdU inkubiert und anschließend fixiert. Bis auf die Fixierung, welche mit 2 % PFA in PBS durchgeführt wurde, wurden alle weiteren Schritte und Chemikalien nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt, bzw. verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem TCS SP5-Konfokalmikroskop (Leica, Mannheim) angefertigt.

2.5 Migrations-Assay

Um die Mobilität der Zellen in einem zweidimensionalen Ansatz studieren zu können, wurde der sogenannte Migrations-Assay (Wundheilungs-Assay) verwendet. Hierbei wird gemessen, wie viel Prozent der Fläche eines künstlich erzeugten Defekts in einem konfluenten Monolayer die Zellen in einem bestimmten Zeitraum wieder verschließen. Versuche dieses Typs wurden in 24-Wellplatten durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Zahl von $2,5 \times 10^5$ pro Well ausgesät und bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen gehalten. Um ein hohes Maß an Vergleichbarkeit zwischen den jeweiligen Bedingungen zu erreichen, wurde speziell auf die möglichst gleiche Dichte des Zellrasens geachtet. Hatten die Zellen Konfluenz erreicht, wurde mittels einer Pipettenspitze (2-200 µl, Eppendorf, Hamburg) ein schmaler Streifen Zellen abgeschabt, sodass ein zellfreier Bereich in der Mitte des Wells entstand (= Wunde). Im Anschluss wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und die Wunde an einer definierten Stelle mittels einer an das Mikroskop (Axio Vert A1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) montierten Digitalkamera (EOS600D, Canon, Tokio, Japan) bei 40facher Vergrößerung fotografiert. Dieses Bild diente als 0 h Referenzbild, um die geschlossene Wund-Fläche nach 8 und 24 h als relativen Wert an der Wund-Fläche bei 0 h ausdrücken zu können. Für die Messung der Wund-Flächen siehe 2.8.

2.6 Lebendzell-Mikroskopie und Phänotypisierung während Migration

Um die migratorischen Fähigkeiten von Pankreaskarzinom-Zellen in Echtzeit untersuchen zu können wurde die Lebendzell-Mikroskopie verwendet. Hierzu wurden die Zellen in 8-Well µ-slide Zellkammern (Ibidi, Martinsried, Deutschland) in einer Zahl von $6,25 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät. Nach Erreichen von Konfluenz wurde dem Zellrasen analog zum Migrations-Assay (siehe 2.5) mit einer Pipettenspitze (0,1-10 µl, Eppendorf, Hamburg) eine Wunde zugeführt. Daraufhin wurde die Zellkammer in eine Inkubationskammer eingespannt, welche auf den automatisierten Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops (DMi 8, Leica, Mannheim, Deutschland) montiert war. Während der gesamten Aufnahmedauer wurden die Zellen bei 37 °C, 100 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Aufnahmebeginn wurden mithilfe des automatisierten Objektisches und der Software „Leica Application Suite X“ (Leica, Mannheim) verschiedene zwischen

den einzelnen Konditionen vergleichbare Positionen markiert. Das Mikroskop wurde so programmiert, dass alle 2-10 min alle markierten Positionen nacheinander abgefahren und aufgenommen wurden. Je nach Versuch wurde die Aufnahme nach 12-24 h beendet. Die Aufnahmen wurden mittels einer an das Mikroskop montierten Digitalkamera (Hamamatsu Orca-Flash 4.0 V2, Hamamatsu-City, Japan) erstellt.

Für die Phänotypisierung der migrierenden Zellen wurden die Aufnahmen zum Zeitpunkt 10 h nach Migrationsbeginn verwendet. Die Zellen wurden je nach Morphologie in zwei Gruppen eingeteilt: Epithelial und mesenchymal. Um den Phänotyp zuverlässig und anhand der Zelldynamik differenzieren zu können, wurden zusätzlich Aufnahmen im Zeitraum 9-11 h nach Migrationsbeginn miteinbezogen. Als Kerncharakteristika für einen epithelialen Phänotyp wurde die Zellpolarität sowie das Ausbilden langstreckiger Zellkontakte herangezogen (Lüllmann-Rauch, 2015). Für eine mesenchymale Kategorisierung sprach das Verlassen des Zellverbands inklusive des Abbaus von Zellkontakten, das Abflachen und Elongieren der Zelle, sowie das Ausbilden eines lamellipodienreichen führenden Zellteils und eines kontraktilen folgenden Zellendes (Kalluri and Weinberg, 2009). Die Zellen wurden je nach Kategorie farbkodiert markiert und gezählt. Des Weiteren wurden die Zellen auch danach beurteilt, ob sie in Kontakt mit anderen Zellen als Front migrieren, oder ob sie sich aus dem Zellverbund lösen und als einzelne Zellen migrieren. Dies wurde analog zur Phänotypisierung anhand der Aufnahme bei 10 h quantifiziert. Als einzeln migrierende Zelle galt jede Zelle, die keine epithelialen Zellkontakte mehr zeigte und sich vom Zellverbund losgelöst hatte.

2.7 cAMP-Assay

Als cAMP-Assay wird eine Methode zur Konzentrationsbestimmung von cAMP in einer Probe Zelllysat bezeichnet. Hierzu wurde das cAMP-Enzyme-Immunoassay-Kit der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA verwendet. Es handelt sich bei diesem Kit um einen kompetitiven Immunoassay. Ein polyklonaler Anti-cAMP-Antikörper bindet entweder freie cAMP-Moleküle oder Konjugate aus cAMP und alkalischer Phosphatase. Dies geschieht in Wells, deren Böden mit Sekundärantikörper gegen den Anti-cAMP-Antikörper beschichtet sind. Nach einem Waschschrift wird para-Nitrophenylphosphat zugegeben. Dieses wird durch die alkalische Phosphatase zu gelbem para-Nitrophenol dephosphoryliert. Je mehr cAMP in der Probe

enthalten ist, desto weniger cAMP-alkalische-Phosphatase-Konjugate sind an den Wellboden gebunden und desto geringer fällt der Farbumschlag aus. Verglichen mit einer logistischen Standardkurve bekannter cAMP-Konzentrationen lässt sich somit die cAMP-Konzentration in der Probe ermitteln.

Die Zellen wurden in einer Zahl von $2,5 \times 10^5$ pro Well in einer 24-Wellplatte ausgesät und mittels 160 μ l 0,1 M Salzsäure (HCl) pro Well lysiert. Alle anderen Schritte und Reagenzien wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt, bzw. verwendet. Der Farbumschlag wurde über die optische Dichte bei 405 nm mit dem Mikroplattenleser Infinite 200 gemessen.

2.8 Analyse und statistische Auswertung des Bild- und Datenmaterials

Für die quantitative Auswertung des Bildmaterials wurde die open-source Software „Fiji“ genutzt (Schindelin et al., 2012). Diese ist eine Distribution der bekannten Analysesoftware „ImageJ“ (Rueden et al., 2017).

Western-Blot-Banden wurden densitometrisch gemessen. Der die jeweilige Bande direkt umgebende Hintergrundwert wurde stets subtrahiert. Um Abweichungen in der geladenen Gesamtproteinmenge zu berücksichtigen, wurden die untersuchten Proteinmengen stets in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Hierfür diente das ubiquitäre Enzym GAPDH. Für Phosphoproteine wurde jeweils die Gesamtmenge aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein als Ladekontrolle benutzt. Die Quantifizierung der Proliferationsrate im EdU-Proliferationsassay wurde in Fiji mittels einer grenzwertbasierten („threshold“) Partikelzählung („analyze particles“) durchgeführt. Die Methode wurde zu Beginn des Experiments durch manuelle Zählung validiert. Die validierten Einstellungen wurden über alle Wiederholungen und Konditionen beibehalten.

Die Flächenmessungen bei Migrations-Assays wurden durch die „Measure-Funktion“ nach Freihand-Markierung der zu messenden Fläche durchgeführt. Die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene Fläche wurde stets in Relation zur Fläche zum Zeitpunkt $t = 0$ h gesetzt.

Die Einzelaufnahmen der Lebendzell-Mikroskopie wurden mittels der „Stack-Funktion“ in Fiji zu Videos editiert.

Die Erstellung der cAMP-Assay-Standardkurve sowie die Ermittlung der jeweiligen Konzentrationen mittels 4-Parameter logistischer Regression wurde mit dem Statistikprogramm Origin 8.1 (Originlab, Northampton, USA) durchgeführt.

Für die weitere Bildbearbeitung, bzw. das Erstellen von Abbildungen oder Schemazeichnungen wurde Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, USA) verwendet.

Für die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung von Diagrammen und Graphen wurde sowohl Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA), als auch das Statistikprogramm Prism 7 (GraphPad, La Jolla, USA) verwendet. Sofern nur zwei Konditionen miteinander verglichen wurden, wurde der doppelseitige ungepaarte Student's t-Test zur Prüfung der Signifikanz genutzt. Bei Versuchen mit mehr als zwei zueinander in Bezug gesetzten Konditionen wurde mittels einfaktorieller ANOVA (engl. analysis of variance) und anschließender Bonferroni-Korrektur auf statistische Signifikanz getestet. Signifikanz wurde ab einem p-Wert $< 0,05$ angenommen. Die in den Abbildungen gezeigten Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardfehler (SEM) graphisch dar.

2.9 Verwendete Reagenzien

2.9.1 Antikörper und Mediatoren

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies/Klonalität	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti-Desmocollin- 2/3	Maus/monoklonal (7G6)	IF 1:100	Invitrogen, Camarillo, USA
anti-Desmoplakin I/II	Maus/monoklonal (A-1)	WB 1:1000 IF 1:100	Santa Cruz, Dallas, USA
anti-DSG2	Maus/monoklonal (10G11)	WB 1:200 IF 1:100	Acris, Herford, Deutschland
anti-E-Cadherin	Maus/monoklonal (36/E-Cadherin)	IF 1:100	BD, Franklin Lakes, USA
anti-EGFR	Kaninchen/polyklonal	WB 1:1000 IF 1:100	Santa Cruz, Dallas, USA

Antikörper	Spezies/Klonalität	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
anti-ERK1/2	Kaninchen/polyklonal	WB 1:1000 IF 1:100	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-GAPDH	Maus/monoklonal (0411)	WB 1:3000	Santa Cruz, Dallas, USA
anti-HER2	Kaninchen/ monoklonal (29D8)	WB 1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-phospho- EGFR (Y845)	Kaninchen/polyklonal	WB 1:1000	Abcam, Cambridge, England
anti-phospho- ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Maus/monoklonal (E-4)	WB 1:1000 IF 1:100	Santa Cruz, Dallas, USA
anti-phospho- HER2 (Tyr1196)	Kaninchen/ monoklonal (D66B7)	WB 1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-Plakoglobin	Maus/monoklonal (PG 5.1)	WB 1:1000 IF 1:100	Progen, Heidelberg, Deutschland

Alle beschriebenen Primärantikörper wurden für den Einsatz in der Western-Blot Immunodetektion in 5 % BSA in TBST verdünnt. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Antikörper in PBS verdünnt.

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Gekoppeltes(r) Enzym/Fluorophor	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
Ziege-anti- Maus	Pox (WB) Cy3, Cy5 (IF)	WB 1:10000 IF 1:600	Dianova, Hamburg, Deutschland

Antikörper	Gekoppeltes(r) Enzym/Fluorophor	Anwendung/ Konzentration	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen	Pox (WB) Cy3, Cy5 (IF)	WB 1:10000 IF 1:600	Dianova, Hamburg, Deutschland

Für Western-Blots wurden die Sekundärantikörper in TBST und für die Immunfluoreszenzdarstellung in PBS eingesetzt. Alexa488-Phalloidin (Life Technologies, Carlsbad, USA) diente der Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts durch Bindung an filamentäres Aktin und wurde ebenfalls in PBS verdünnt.

Tabelle 5: Verwendete Mediatoren

Name	Funktion	Konzentration	Hersteller
Forskolin	Stimulation der Adenylylcyclase	5 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rolipram	Inhibition der Phosphodiesterase 4	10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Bei der Verwendung von Mediatoren wurde stets darauf geachtet, die jeweiligen Kontrollkonditionen unter identischen Bedingungen zu halten. Forskolin/Rolipram (F/R) wurde im Western Blot und cAMP-Assay standardmäßig als Mediator-Kombination für 4 h inkubiert. Für die Migrationen wurde F/R direkt nach Zufügen der Wunde zugegeben und für das gesamte Experiment im Medium belassen.

2.9.2 Puffer und Lösungen

Dieses Kapitel enthält eine Auflistung aller nicht im jeweiligen Methodenkapitel detailliert beschriebenen Puffer und Lösungen.

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Methode	Komponenten	Hersteller
BSA/NGS	IF	0,1 % Bovines Serum Albumin 10 % Ziegenserum in PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Jackson Immuno-Research, West Grove USA

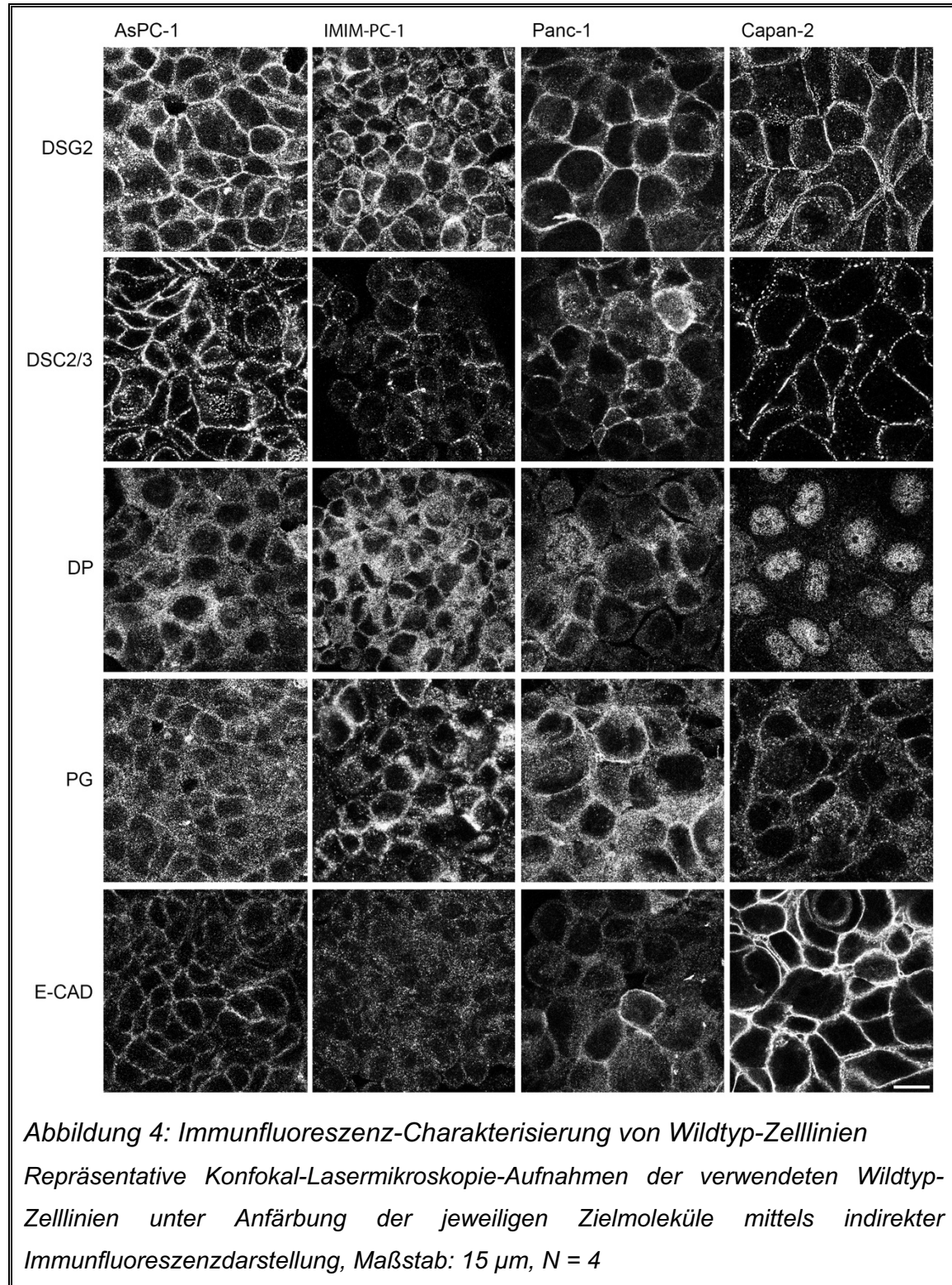
Bezeichnung	Methode	Komponenten	Hersteller
ECL I	WB	500 µl Luminol-Lösung 220 µl PCA-Lösung 5 ml 1 M Tris-HCl <i>ad 50 ml H₂O</i>	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis, USA AppliChem, Darmstadt -
ECL II	WB	32 µl H ₂ O ₂ , 5 ml 1 M Tris-HCl <i>ad 50 ml H₂O</i>	AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt -
KCM-Puffer	Trans-formation	0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25 M MgCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe
Laemmli-Puffer	WB	0,19 M Tris/HCl 0,2 M SDS 4,1 M Glycerin 0,3 mM Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe AppliChem, Darmstadt
Laufpuffer	WB	1 M Glycin 124 mM Tris/HCl 17,3 mM SDS	Carl Roth, Karlsruhe AppliChem, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe
LB-Agarplatten	Trans-formation	25 g/L LB-Medium Pulver 15 g/L Agar	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Medium	Trans-formation	20 g/L LB-Medium Pulver 5 g/L NaCl	AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt

Bezeichnung	Methode	Komponenten	Hersteller
PBS	Allgemein	0,68 M NaCl 13,4 mM KCl 48 mM Na ₂ HPO ₄ 7,3 mM KH ₂ PO ₄	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe
SDS-Lysepuffer	WB	25 mM HEPES 2 mM EDTA 25 mM NaF 1 % SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe
Strippingpuffer	WB	25 mM Glycin 1 % SDS pH 2,0	Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe
TAE-Puffer (50x)	Agarose-Gelelektrophorese	242 g Tris in 500 ml H ₂ O 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) 57,1 ml Eisessig <i>ad 1 l H₂O</i>	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe -
TBS	WB	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl	AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt
TBST	WB	0,05 % Tween 20 in TBS	AppliChem, Darmstadt -
Transferpuffer (5x)	WB	25 mM Tris/HCl 195 mM Glycin 250 ml Methanol 3,5 mM SDS	AppliChem, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe Carl Roth, Karlsruhe

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung verwendeter Zelllinien

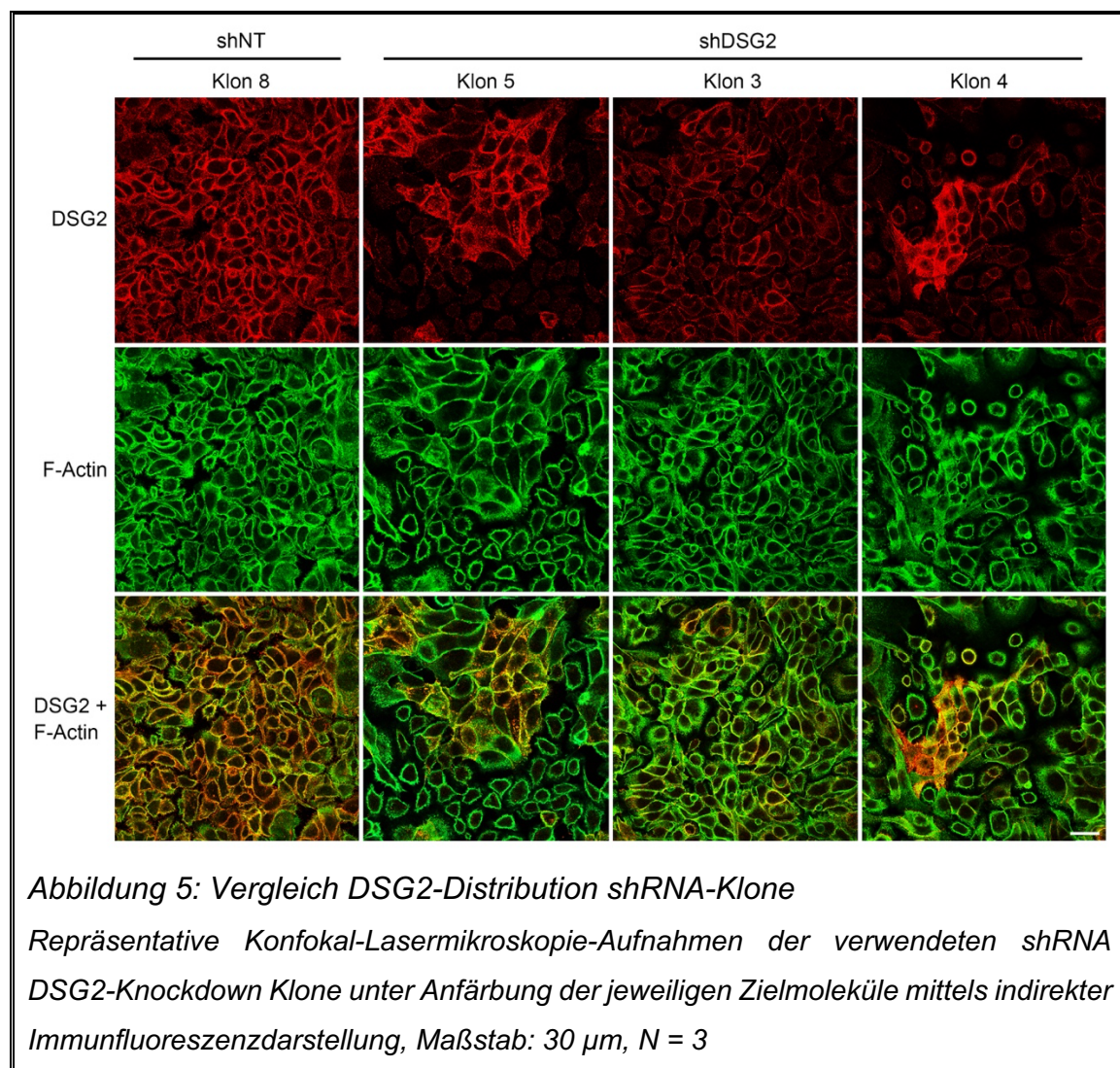
3.1.1 Wildtyp-Zelllinien



Zu Beginn der Studie wurden alle verwendeten Wildtyp-Zelllinien mittels Immunfärbung auf die Expression von DSG2, DSC2/3, DP, PG und E-Cadherin

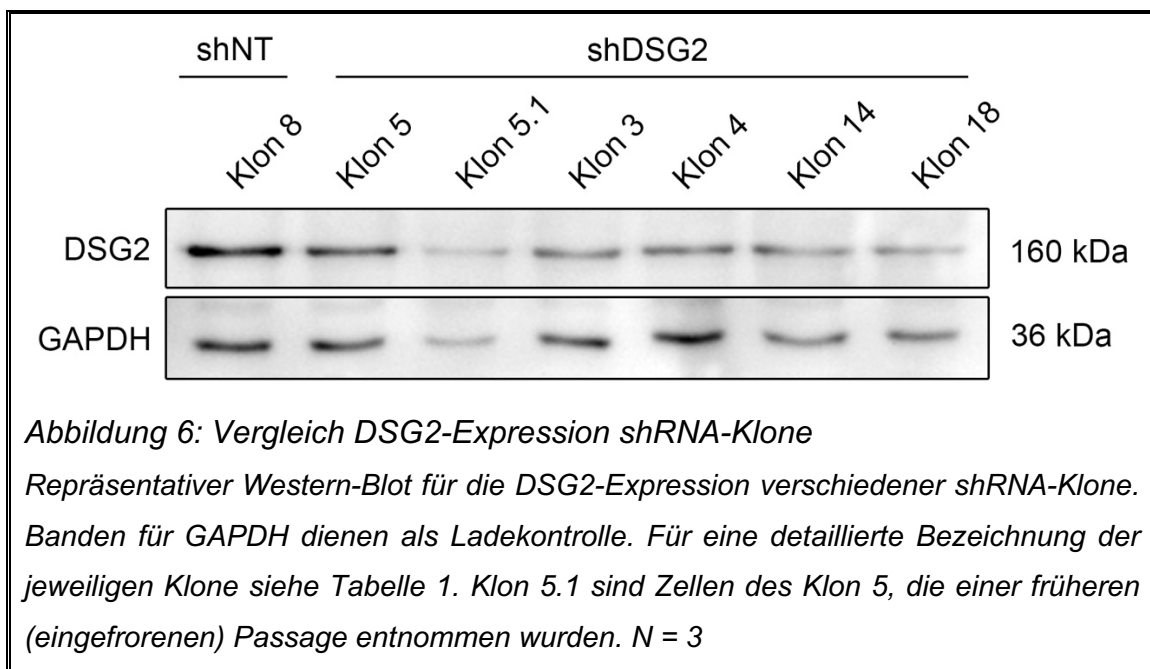
(E-CAD) untersucht (siehe Abbildung 4). Hierbei wurde deutlich, dass verschiedene Pankreaskarzinom-Zelllinien deutliche Unterschiede in der Expression dieser Zelladhäsions-Proteine aufweisen. Während man bei DSG2 eine relativ ähnliche membranständige Distribution beobachten kann, sind die Unterschiede bei DP und PG deutlich größer. In Capan-2 Zellen scheint Desmoplakin sogar vermehrt im Nukleus anzutreffen zu sein. Ebenfalls auffallend ist die prominente membranständige Färbung von E-CAD in Capan-2. Basierend auf der relativ homogenen, membranständigen Färbung von DSG2 und DSC2/3 in den AsPC-1-Zellen, wurde diese Zelllinie für die Knockout-Herstellung ausgewählt.

3.1.2 *shRNA DSG2-Knockdown-Zelllinien*



Da während der Generierung der CRISPR/Cas9-Knockouts parallel bereits bestehende DSG2-Knockdown-Zelllinien eingesetzt werden sollten, wurden diese ebenfalls charakterisiert. Um einen Eindruck über die drei nach Wachstum und

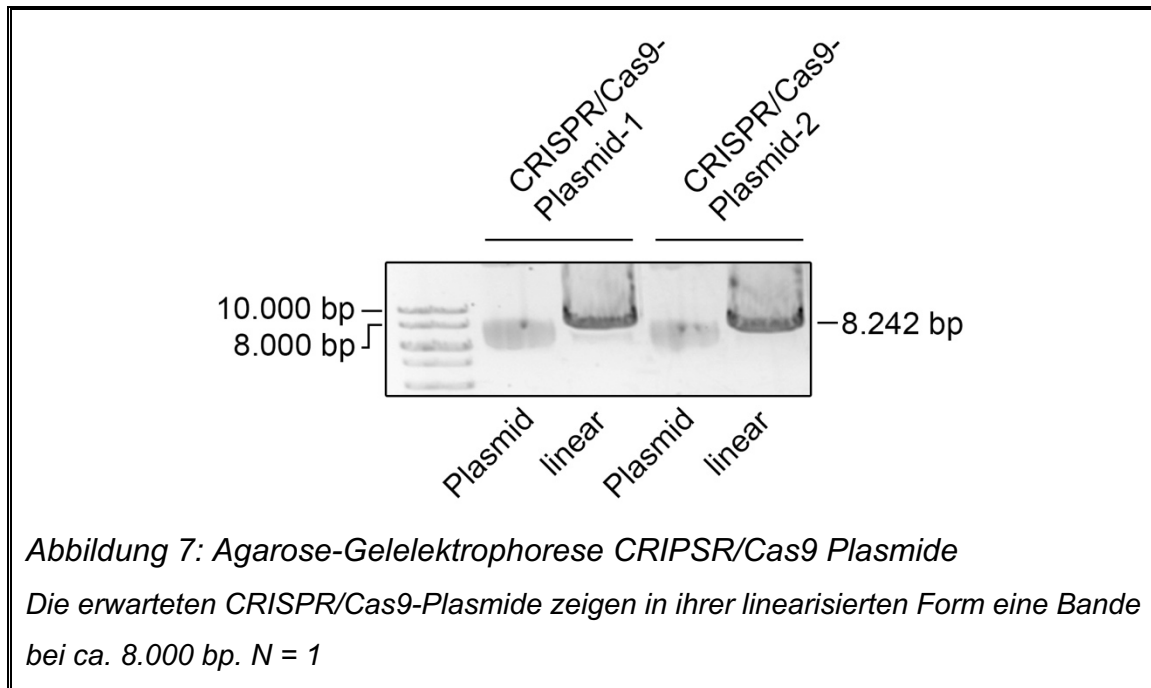
Zellmorphologie vorausgewählten DSG2-Knockdown Klone (Klon 3, 4, 5) hinsichtlich ihrer DSG2 Distribution zu erlangen, wurden diese mit dem Kontroll-Klon (Klon 8) verglichen. Dieser wurde mit einem Plasmid, das für eine irrelevante shRNA (shNT) codiert, transfiziert. Die homogenste Reduktion des DSG2-Signals zeigte in diesem Versuch Klon 3. Um die Zellmorphologie besser beurteilen zu können, wurde zusätzlich F-Actin angefärbt. Hierbei ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen. Um den DSG2-Verlust quantitativ vergleichen und einen Standard-Klon für weitergehende Experimente auswählen zu können, wurde weiterhin mittels Western-Blot auf DSG2-Expression getestet.



Im Western-Blot wurde die unterschiedliche Effizienz des shRNA vermittelten DSG2-Knockdowns deutlich. Während zum Beispiel Klon 5 einen relativ geringen DSG2-Verlust zeigte, war dieser bei Klon 3 und 4 ausgeprägter. Des Weiteren zeigte sich vor allem bei Klon 5 eine Instabilität des Knockdowns über mehrere Passagen. Deshalb wurden auch unterschiedliche Passagen desselben Klons getestet (Klon 5.1). Letztendlich wurde Klon 3 aufgrund seiner guten Wachstumseigenschaften, eines stabilen DSG2-Verlusts im Western-Blot und einer homogenen interzellulären DSG2-Distribution in der Immunfluoreszenzdarstellung (siehe Abbildung 5) als Standardklon gewählt.

3.1.3 CRISPR/Cas9 DSG2-Knockout-Zelllinien

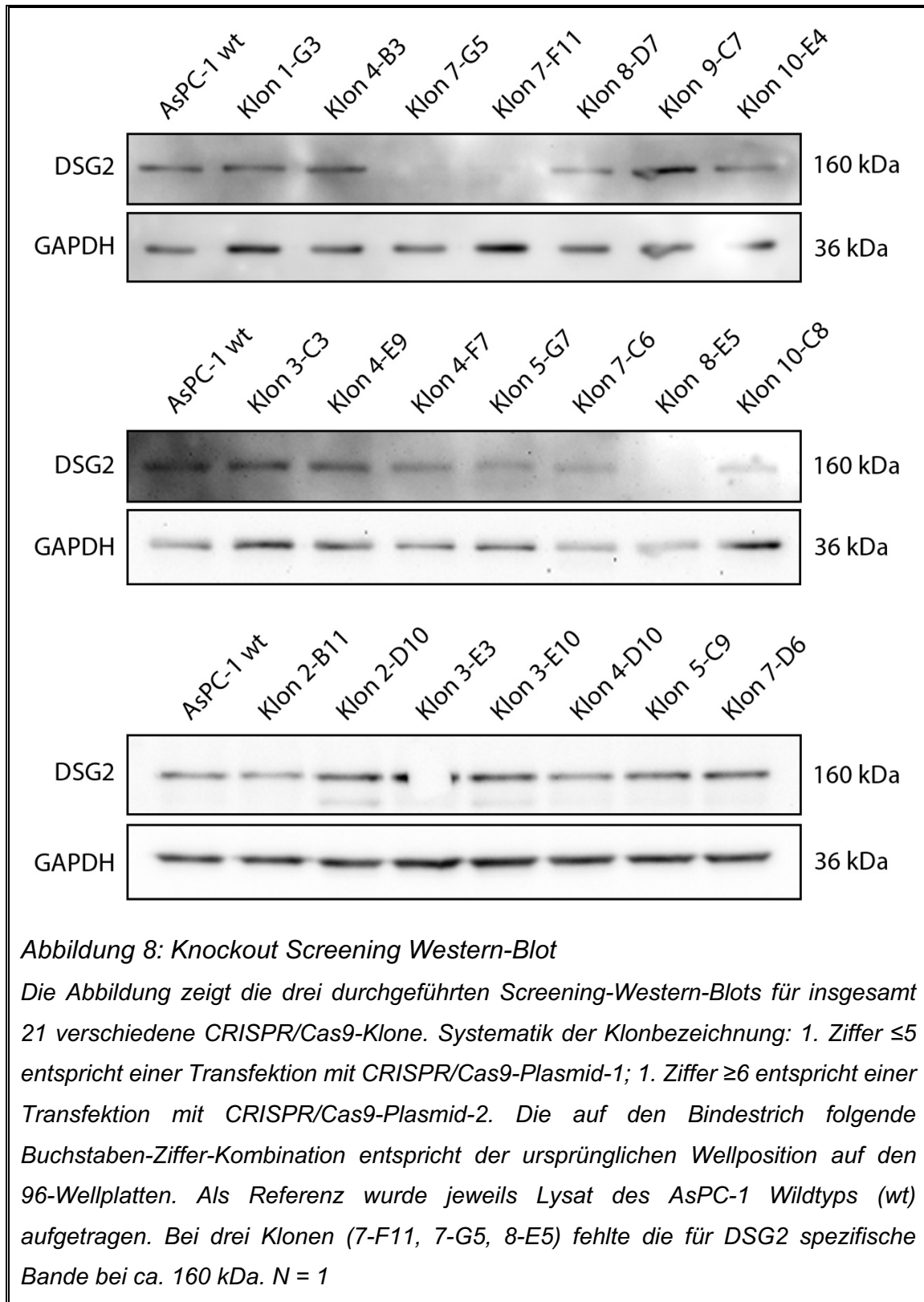
Vor der Generierung der CRISPR/Cas9-Knockouts mussten die gelieferten Plasmide zuerst in *E. coli* transformiert werden. Nach der Transformation wurde die korrekte Größe des Plasmids mittels Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.



Laut Herstellerinformationen besitzen die CRISPR/Cas9-Plasmide eine Länge von 8.242 bp. Dies stimmte mit den Banden der linearisierten Form in der Agarose-Gelelektrophorese überein und deutete die korrekte Vervielfältigung der gewünschten Plasmide an.

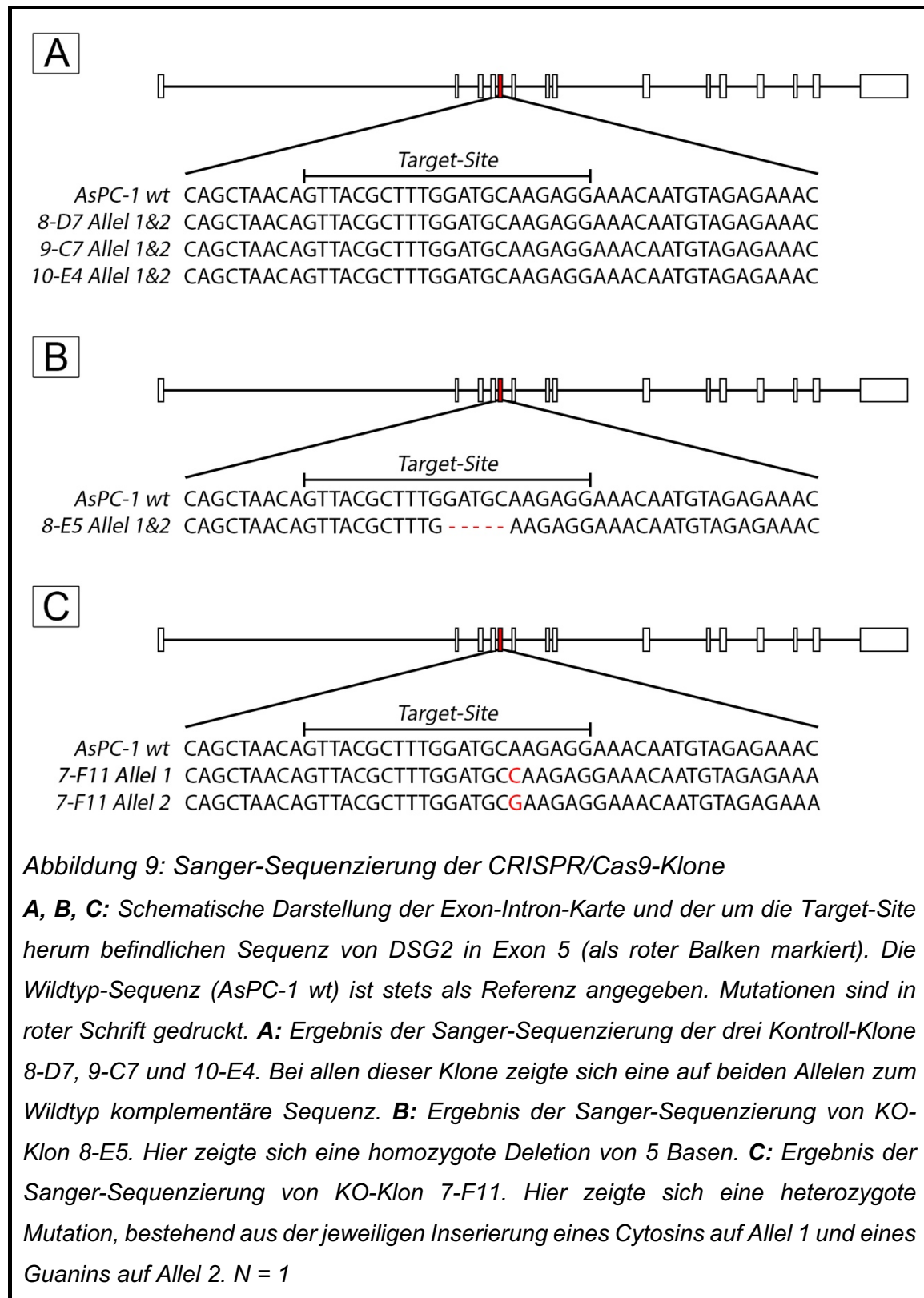
In der anschließenden Konzentrationsmessung wurden Konzentrationen von ca. 0,9 µg/µl und Reinheitswerte (OD 260 nm / OD 280 nm) von 1,9 bestimmt.

Nach der Transfektion und der Aufzucht der Einzelzellklone wurden Western-Blot-Analysen zum Nachweis eines DSG2-Knockouts auf Proteinebene durchgeführt. Dieser Versuch diente als erstes Screening für weitere Charakterisierungsschritte, bzw. weitere Nachweise des Knockouts auf Gen-Ebene.

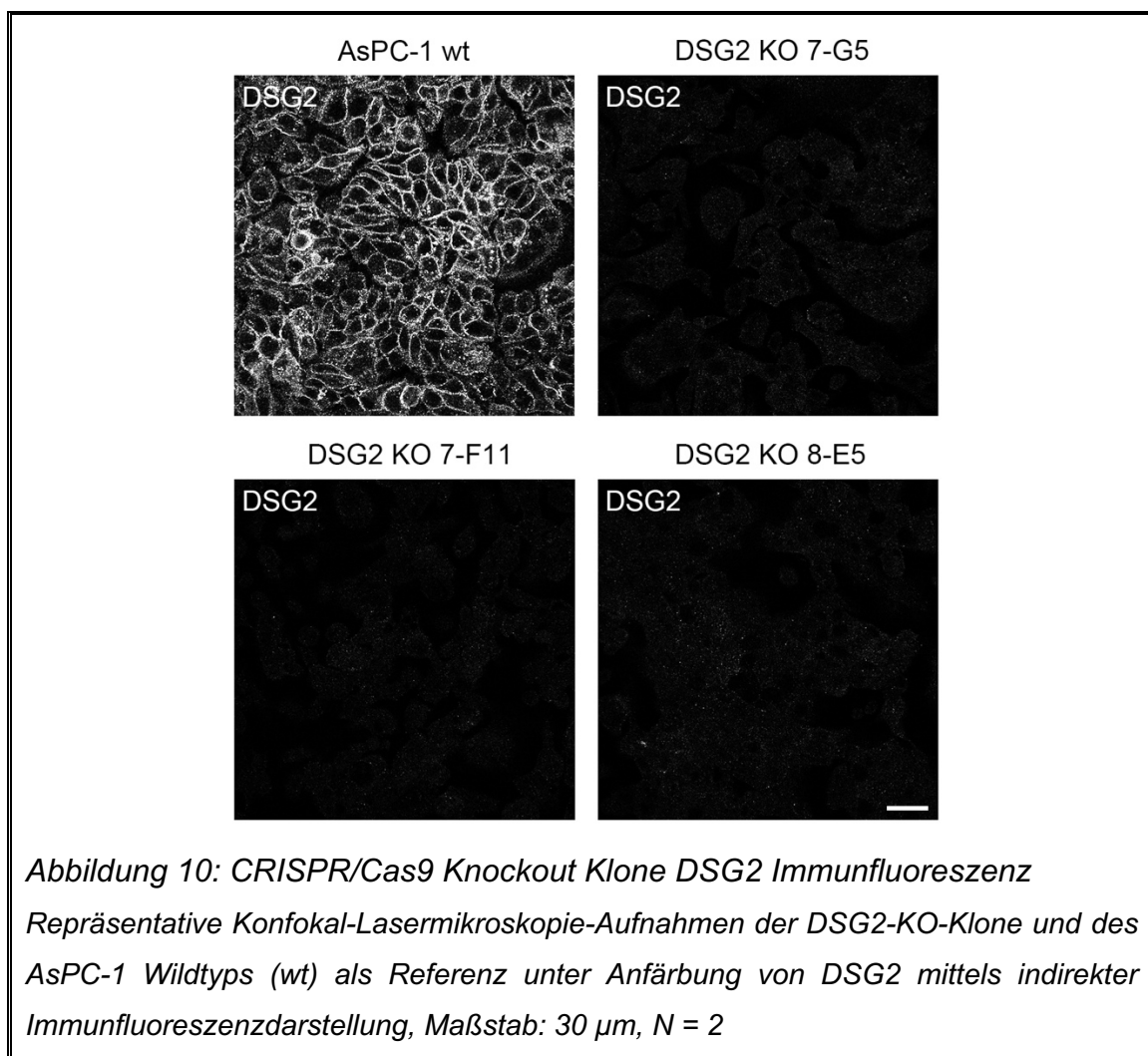


Auffallend war, dass nur diejenigen Klone Mutationen aufwiesen, welche mit CRISPR/Cas9-Plasmid-2 transfiziert wurden (vgl. Tabelle 2). Dies bedeutete, dass in der nachfolgenden Sequenzierung die Target-Site in Exon 5 mit angrenzenden Bereichen zu untersuchen war. Zudem kamen für die jeweiligen Knockouts als Kontroll-Zellklone nur diejenigen Klone in Frage, welche ebenfalls mit

CRISPR/Cas9-Plasmid-2 transfiziert wurden. Für die Sequenzierung wurden daher die folgenden Klone ausgewählt: 8-D7, 9-C7 und 10-E4 (Kontrolle) sowie 7-G5, 7-F11 und 8-E5 (KO).

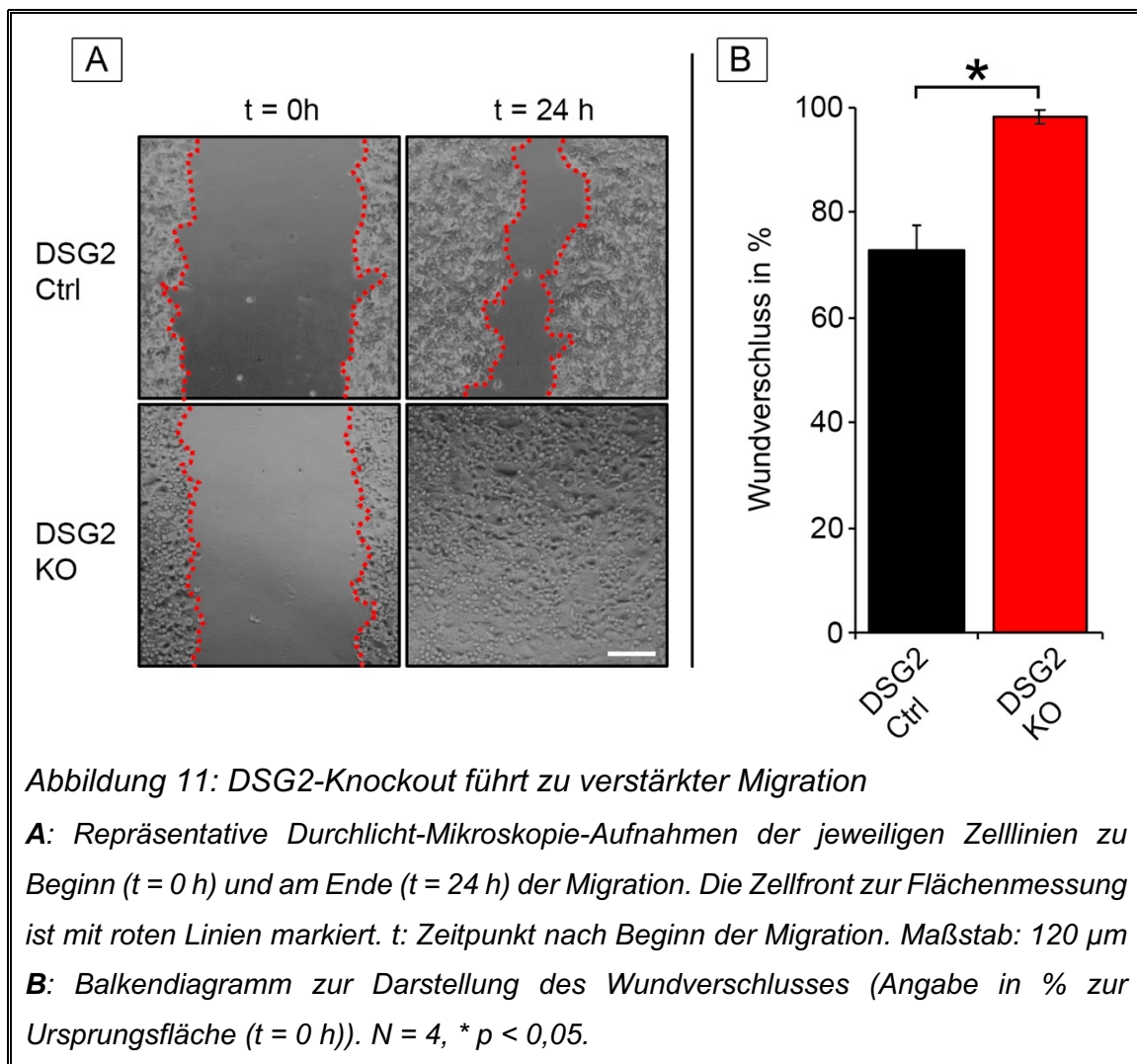


In der Sequenzierung zeigten sich bei zwei von drei (7-F11 und 8-E5) im Western-Blot detektierten DSG2-Knockout-Klonen eindeutige Mutationen innerhalb der Target-Site (siehe Abbildung 9). Diese Mutationen führten jeweils zur Verschiebung des Leserasters und konsekutiv zur Ausbildung eines Stopcodons innerhalb von Exon 5. Bei KO-Klon 7-G5 konnte trotz stabilem Knockout im Western-Blot keine eindeutige Mutation in der Sanger-Sequenzierung identifiziert werden. Daher wurde dieser Klon nach der Charakterisierung von weiterführenden Experimenten ausgeschlossen. Bei den getesteten Kontroll-Klonen (8-D7, 9-C7, 10-E4) konnte eine zum Wildtyp komplementäre Sequenz im Bereich um die Target-Site nachgewiesen werden.



Zur weiteren Charakterisierung der CRISPR/Cas9-Klone und zur Sicherstellung, keine Mischkulturen mit DSG2-positiven Einzelzellen erzeugt zu haben, wurde eine Immunfluoreszenzdarstellung unter Anfärbung von DSG2 durchgeführt (Abbildung 10). Hier zeigte sich bei allen KO-Klonen ein vollständiges Ausbleiben jeglichen spezifischen DSG2-Signals über das gesamte Präparat.

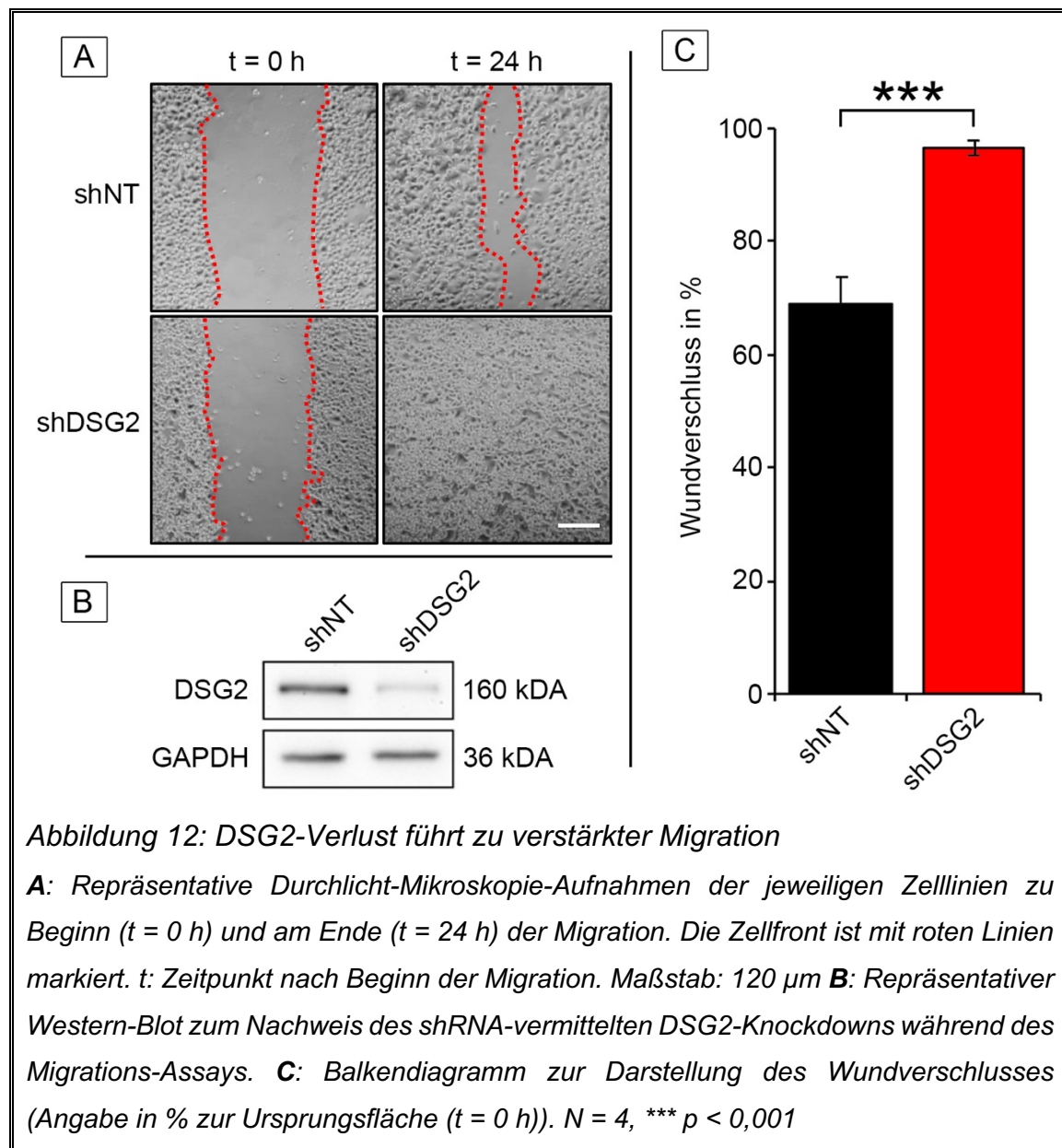
Nach der Charakterisierung wurden Standardklone für weiterführende Experimente bestimmt. Die Klonen 8-E5 als Knockout und 9-C7 als Kontrolle wurden hierfür ausgewählt. Sie werden im Weiteren auch als DSG2 KO bzw. DSG2 Ctrl bezeichnet. Da die oben gezeigten Charakterisierungsstudien parallel zu Versuchen mit den in Tabelle 1 beschriebenen shRNA-Knockdown-Zelllinien durchgeführt wurden, war zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt, dass ein Verlust von DSG2 zu einer Verstärkung der Migration führt (vgl. Kapitel 3.2.1). Auf Basis dieser Daten wurden die neu generierten DSG2-Knockout-Zellen im Sinne einer phänotypischen Charakterisierung ebenfalls auf ihre migratorischen Eigenschaften hin untersucht. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis hierzu durchgeführter Migrations-Assays. In Analogie zu den Ergebnissen mit DSG2-Knockdown-Zellen (vgl. Kapitel 3.2.1) führt das Fehlen von DSG2 zu einer signifikanten Steigerung der Migration.



3.2 Die Auswirkungen eines DSG2-Verlusts auf Pankreaskarzinom-Zellen

3.2.1 Verlust von DSG2 verstärkt Migration

Parallel zur Generierung und initialen Charakterisierung der DSG2-KO-Zelllinie wurde die bereits im Labor vorbestehende Knockdown-Zelllinie shDSG2 untersucht. Diese Zelllinie basiert wie die neu hergestellten DSG2-Knockouts auf der AsPC-1-Linie. Als erste phänotypische Studie hinsichtlich des Einflusses von DSG2 auf Pankreaskarzinom-Zellen wurde der Migrations-Assay verwendet.

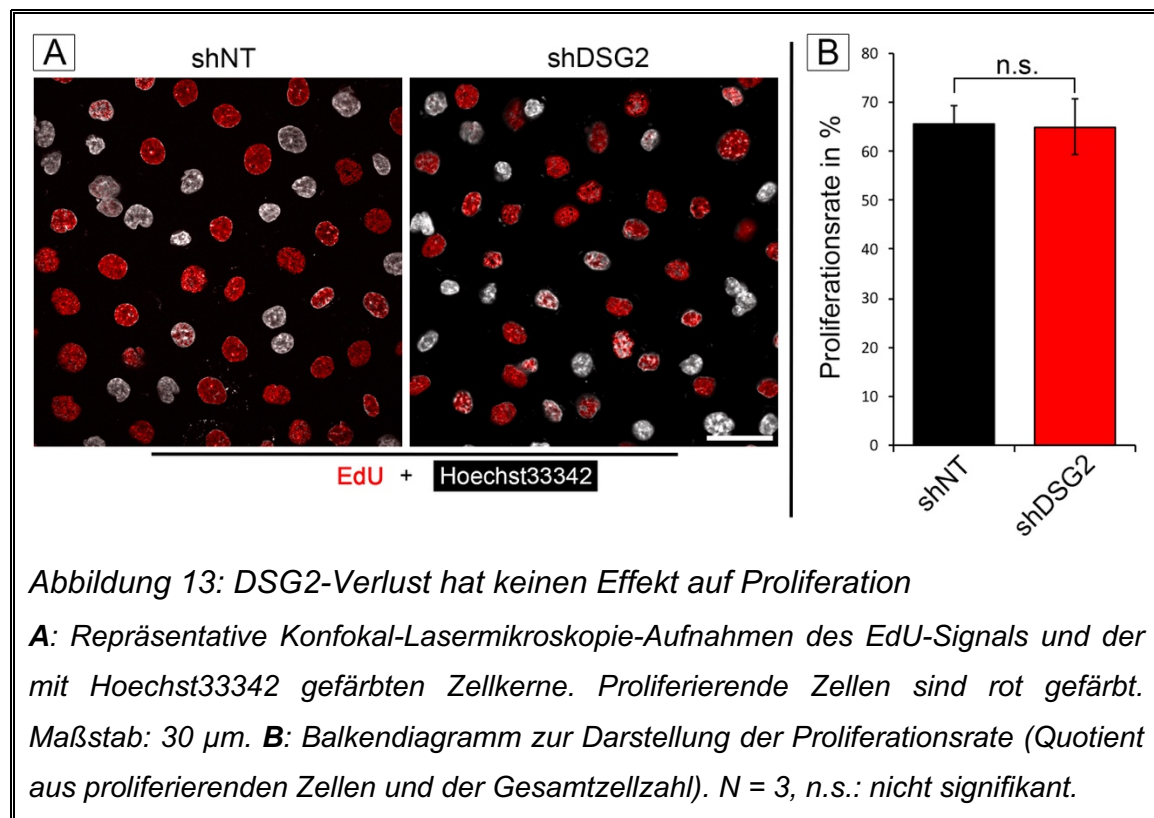


Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, führt ein DSG2-Verlust zu einer deutlichen Verstärkung der Migration. Während die Kontrollen zum Zeitpunkt 24 h die

künstlich erzeugte Wunde in keinem Fall vollständig bedeckten, war bei DSG2-defizienten Zellen nach 24 h meist keine unbedeckte Fläche mehr zu sehen. Nach Auswertung der Flächenmessung ergab sich eine signifikante Erhöhung des Wundverschlusses in shDSG2-Zellen. Zur Kontrolle des shRNA-vermittelten DSG2-Knockdowns wurden nach der Migration die jeweiligen Zellen und korrespondierenden Kontrollen lysiert und im Western-Blot auf das Vorhandensein eines Knockdowns geprüft.

3.2.2 DSG2-Verlust hat keinen Einfluss auf die Proliferationsrate

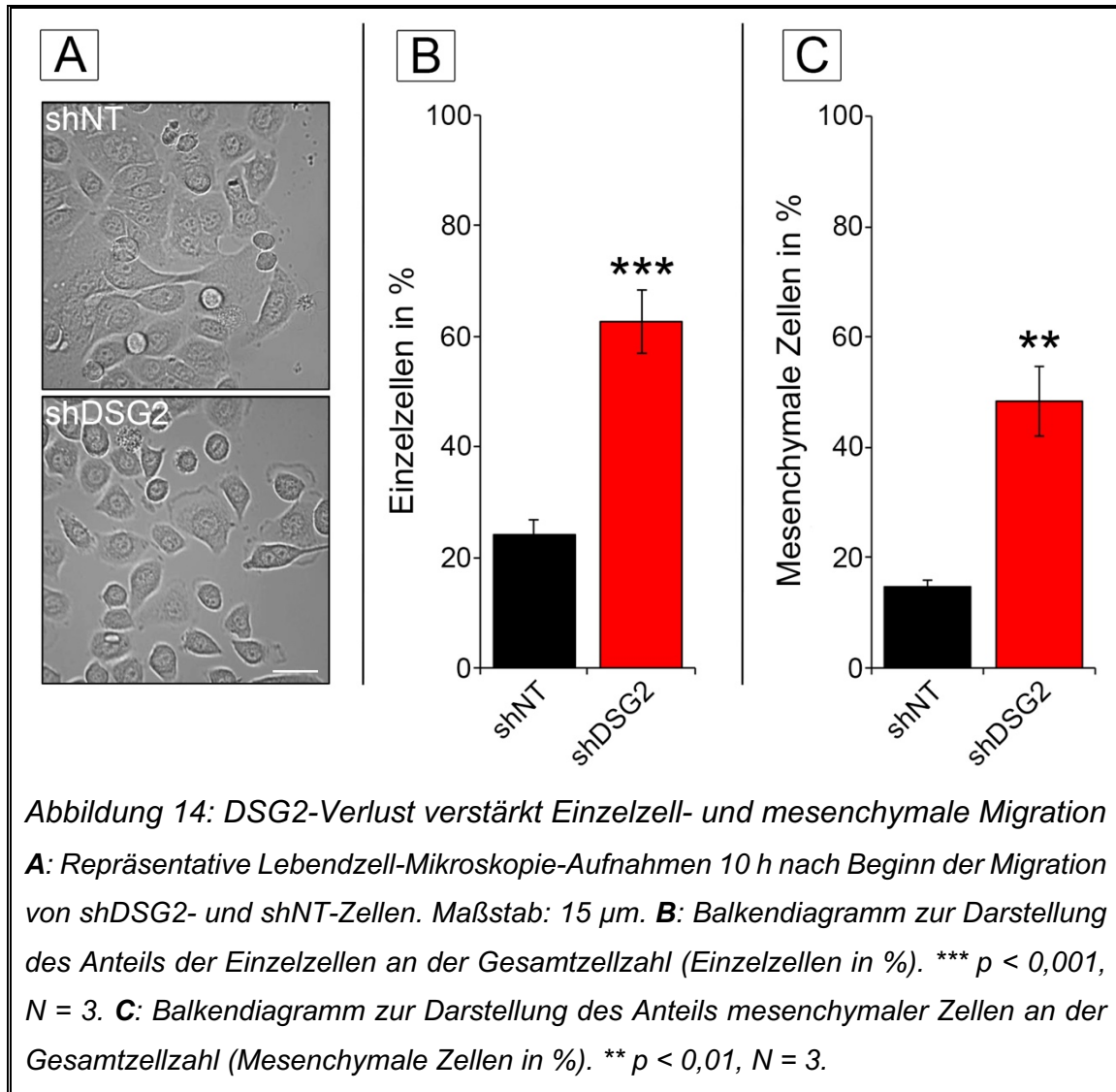
Um etwaige Einflüsse eines DSG2-Verlusts auf die Proliferationsrate zu detektieren, wurde ein EdU-Proliferationsassay durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass ein DSG2-Knockdown keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate verursacht (Abbildung 13).



3.2.3 Verlust von DSG2 führt zur Reduktion des epithelialen Phänotyps

Um weitere phänotypische Effekte eines DSG2-Verlusts nachweisen zu können, wurden Lebendzell-Mikroskopie-Versuche durchgeführt. Spezieller Fokus lag dabei auf dem Verhalten der Zellen während der Migration. Bei genauem Studium der mittels Zeitraffer-Videos gewonnenen Aufnahmen, wurde deutlich, dass DSG2-defiziente Zellen während der Migration einen verstärkt mesenchymalen

Phänotyp ausbilden und insgesamt deutlich mobiler erscheinen. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Zellen vermehrt als Einzelzellen, losgelöst aus dem epithelialen Zellverband, migrieren. Die Kontroll-Zellklone hingegen behielten ihren epithelialen Phänotyp weitestgehend bei und migrierten als Einheit (Abbildung 14).

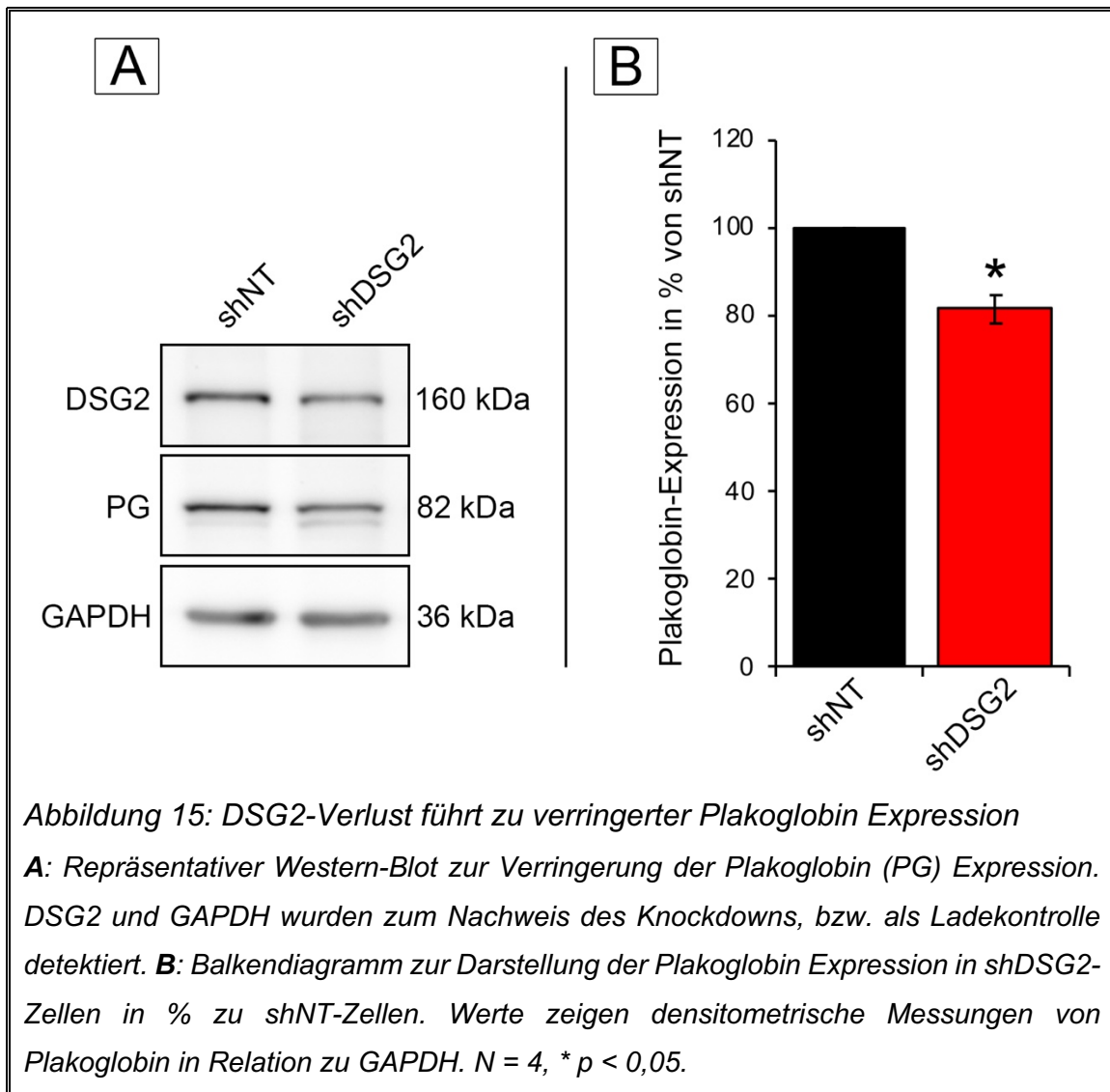


3.2.4 Durch DSG2-Verlust beeinflusste Signalwege und Proteinexpression

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten durch DSG2-Verlust bedingte Veränderungen in der Proteinexpression, bzw. in der Aktivierung von Signalwegen nachgewiesen werden. Besonders der durchgeführte Kinase-Screen gab spezifische Hinweise auf verschiedenste Signalwegsalterationen (Hütz et al., 2017). Darauf basierend wurden in der vorliegenden Studie einige dieser Signalmoleküle genauer untersucht.

3.2.4.1 Verringerung der Plakoglobin-Expression

In Western-Blot-Analysen zur Expression verschiedener desmosomaler Proteine war besonders die Verringerung der Plakoglobin-Expression in den DSG2-Knockdown Zellen auffallend. Während andere desmosomale Proteine, wie z.B. das Cadherin DSC2/3, keine signifikanten Veränderungen zeigten, konnte diese für Plakoglobin mit einer Verringerung um 18 % nachgewiesen werden (Abbildung 15).

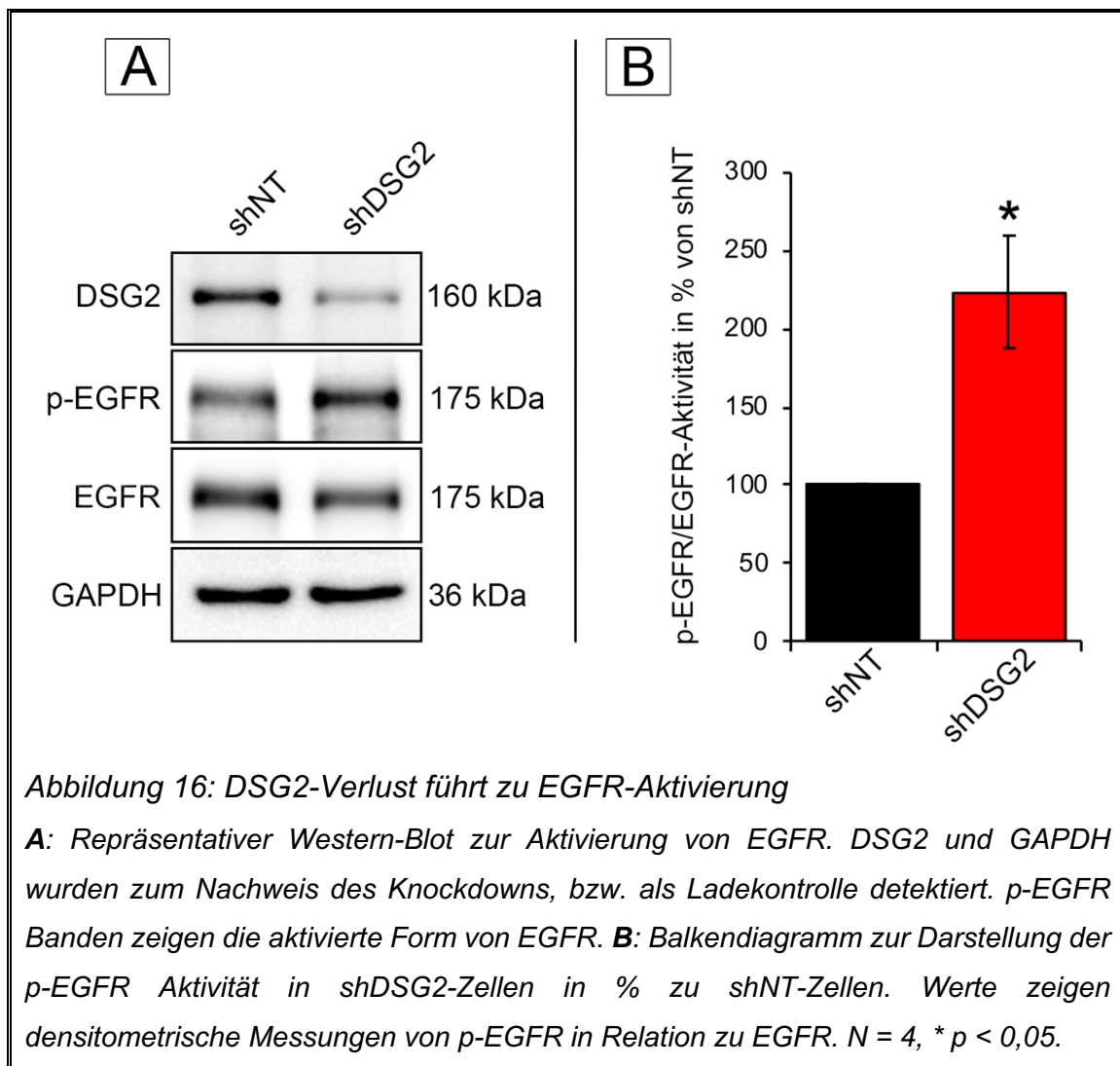


3.2.4.2 Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs

Weiter wurde anhand der Daten des Kinase-Screens die Aktivität einiger klassischer potentiell onkogener Signalwege untersucht. Einer der am häufigsten deregulierten Signalwege beim Pankreaskarzinom ist der kanonische MAP-Kinase Signalweg (engl. mitogen-activated protein-kinase) (Ottenhof et al., 2011). Essentieller Bestandteil dieses Signalwegs sind die funktionell weitestgehend

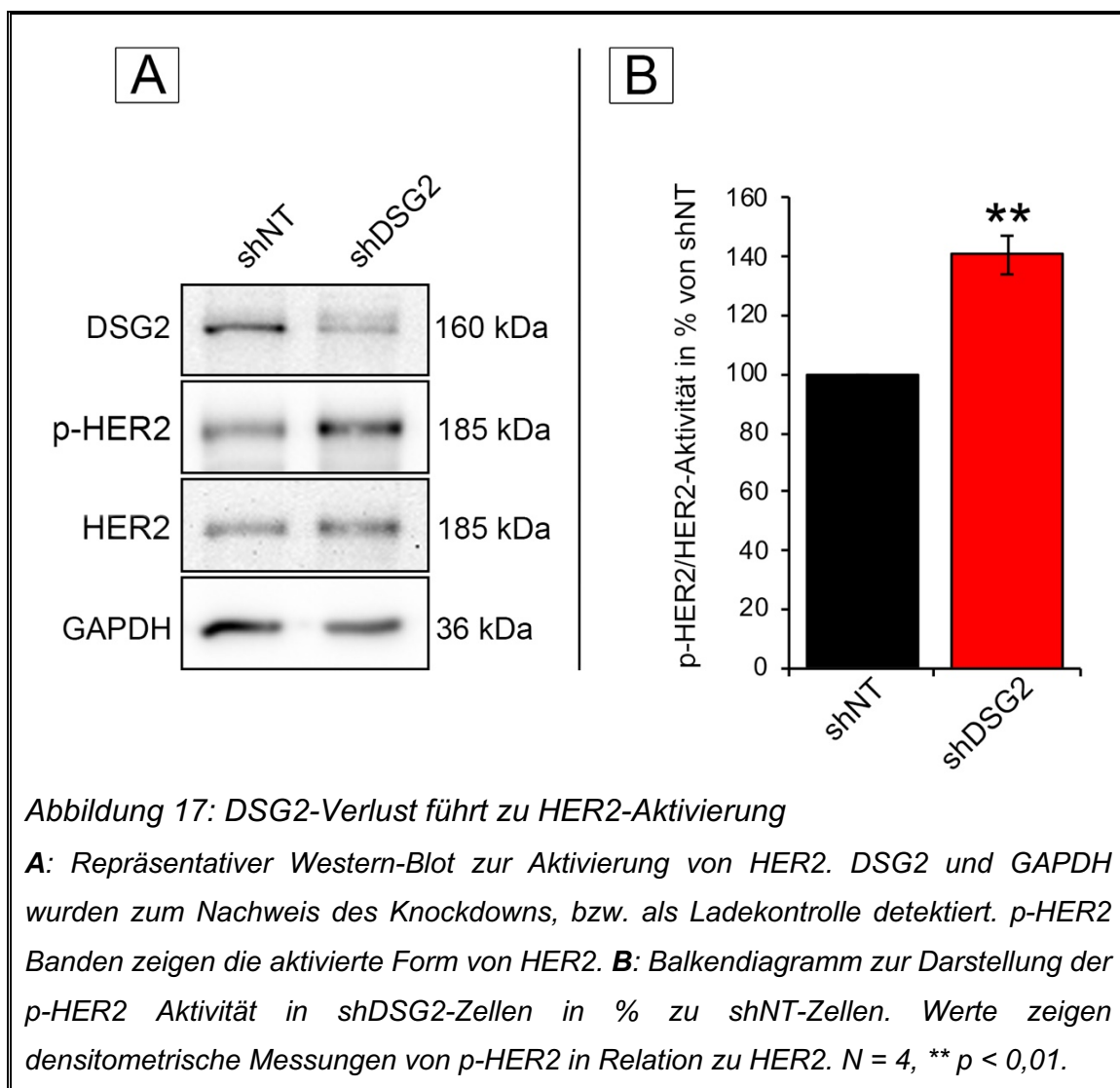
redundanten Kinasen ERK 1 und 2 (engl. extracellular signal-regulated kinase) (Busca et al., 2016), die unter anderem durch epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren beeinflusst werden (EGFR = engl. epidermal growth factor receptor) (Wang et al., 2012). Diese Rezeptoren sind dafür bekannt, in der malignen Entartung von verschiedenen Tumorentitäten eine wichtige Rolle zu spielen. Sie fördern bei Aktivierung unter anderem die Proliferation und verringern die Apoptoserate (Wee and Wang, 2017). Weiter sind sie in den vergangenen Jahren immer mehr als potentielle Ziele für eine zielgerichtete Antikörpertherapie in den Fokus der modernen Krebsforschung gerückt (Herbst and Shin, 2002).

Um nachweisen zu können, ob der Verlust von DSG2 einen Einfluss auf die Aktivität dieser epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren besitzt, wurden erneut Western-Blot-Analysen durchgeführt. Um die Aktivität von EGFR bestimmen zu können, wurde im Western-Blot die phosphorylierte Isoform (p-EGFR = aktiviert) detektiert und ins Verhältnis zu Gesamtmenge an EGFR gesetzt.



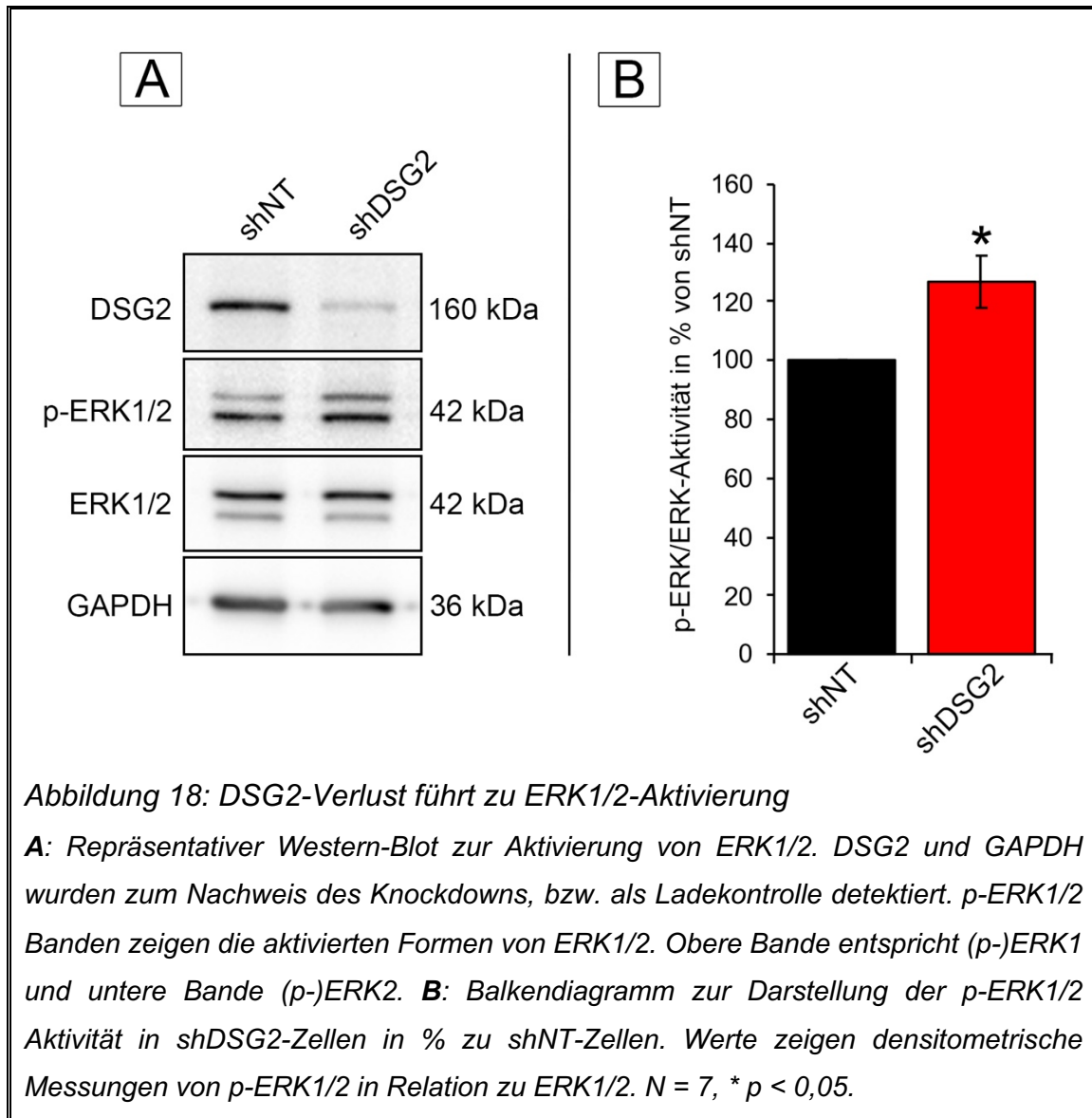
Umso mehr die aktive Form in Relation zur inaktiven Form vorliegt, desto höher ist die Aktivität des Signalwegs. Für EGFR konnte hierbei eine Steigerung der Aktivität auf 223 % relativ zur Kontrolle gemessen werden (Abbildung 16).

Weiter wurde die Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 untersucht (HER2 = engl. human epidermal growth factor receptor 2). Da diese Wachstumsfaktor-Rezeptoren in ihrer aktiven Form als Dimere vorliegen und EGFR mit HER2 Heterodimere bilden kann (Wang et al., 2012), wurde analog zu EGFR eine Aktivierung von HER2 vermutet. Dies konnte mittels Western-Blot-Analysen bestätigt werden. Der Verlust von DSG2 führte zu einer Aktivitätssteigerung von HER2 auf 141 % relativ zur Kontrolle (Abbildung 17).



Nachdem eine Aktivitätssteigerung dieser beiden Wachstumsfaktor-Rezeptoren nachgewiesen war, galt es den Effekt auf die nachgeschaltete Phosphorylierungskaskade zu untersuchen. Die am Ende der MAPK-Kaskade stehenden Kinasen und damit direkte Aktivatoren zahlreicher Transkriptionsfaktoren sind ERK1/2.

Somit sollte als nächster Schritt die Aktivitätsbestimmung dieser Signalmoleküle folgen. Hierfür wurden abermals Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 18 dargestellt. In den *DSG2*-Knockdown-Zellen konnte eine signifikante Erhöhung der ERK1/2 Aktivität um 23 % gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.



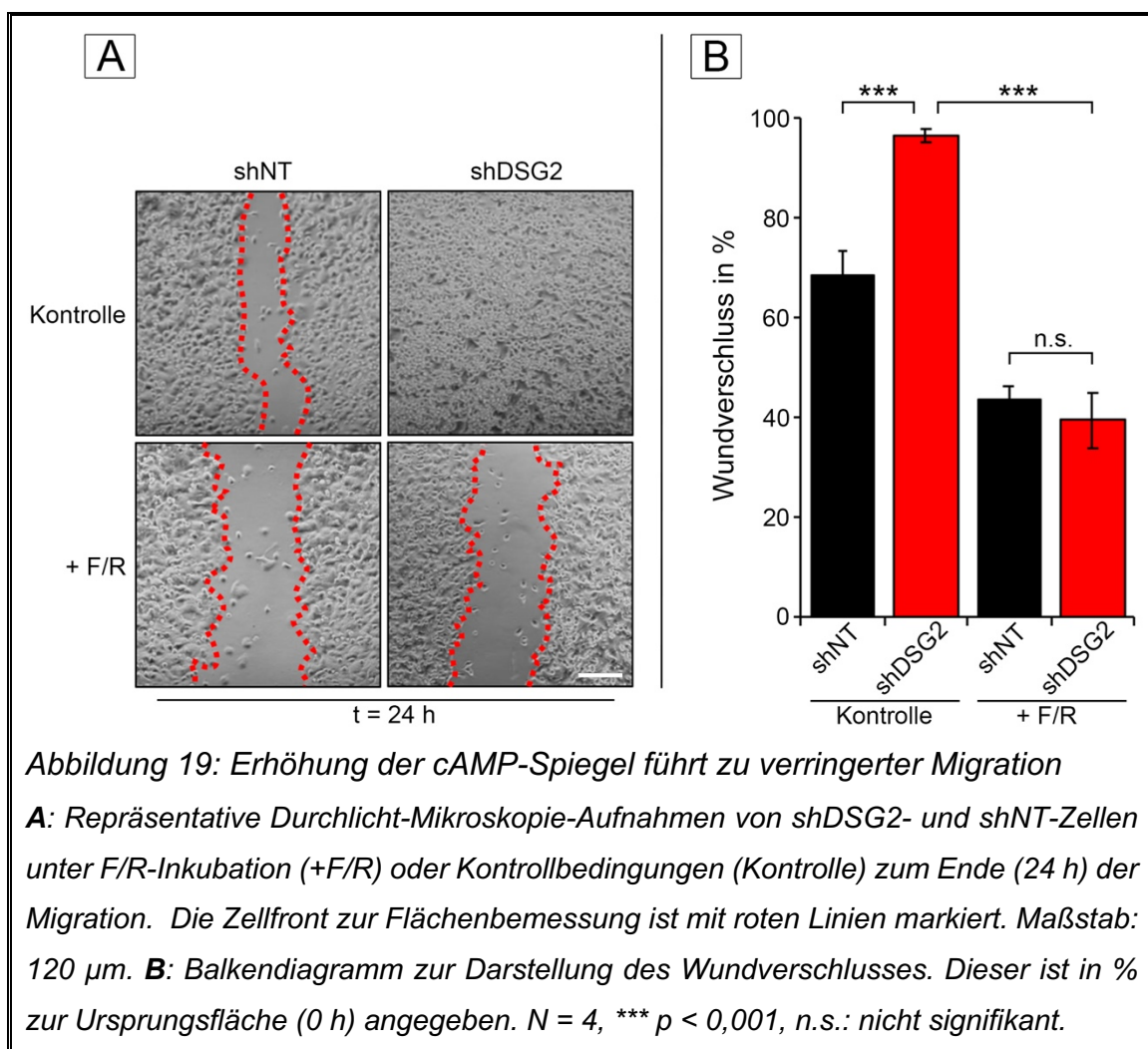
3.3 Einfluss von cAMP auf Signalwege und Phänotyp von AsPC-1-Zellen

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, kann eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel zu einer Steigerung der interzellulären Adhäsion führen. Mit dem Ziel, die durch den Verlust von DSG2 bedingten malignitätssteigernden Effekte zu antagonisieren, wurde im Folgenden untersucht, welche Effekte durch eine mediatorvermittelte Erhöhung der cAMP-Spiegel in diesen Zellen bewirkt werden.

Der Fokus lag hier wieder auf Migration, Phänotypisierung und der Beeinflussung protoonkogener Signalmoleküle. Als Mediatoren für die Erhöhung der cAMP-Spiegel in den folgenden Experimenten, wurde eine Kombination aus Forskolin und Rolipram (F/R) eingesetzt (siehe Tabelle 5). Diese Mediatoren sind bekannt für ihren starken intrazellulären cAMP-Spiegel steigernden Effekt und finden in vielen unterschiedlichen Forschungsbereichen zu diesem Zweck Verwendung. So werden sie beispielsweise auch verwendet, um experimentell cAMP im Endothel oder in Keratinozyten zu erhöhen und die Barriere bzw. die Zell-Zell-Haftung zu verstärken (Spindler et al., 2010).

3.3.1 Erhöhung der cAMP-Spiegel verringert Migration

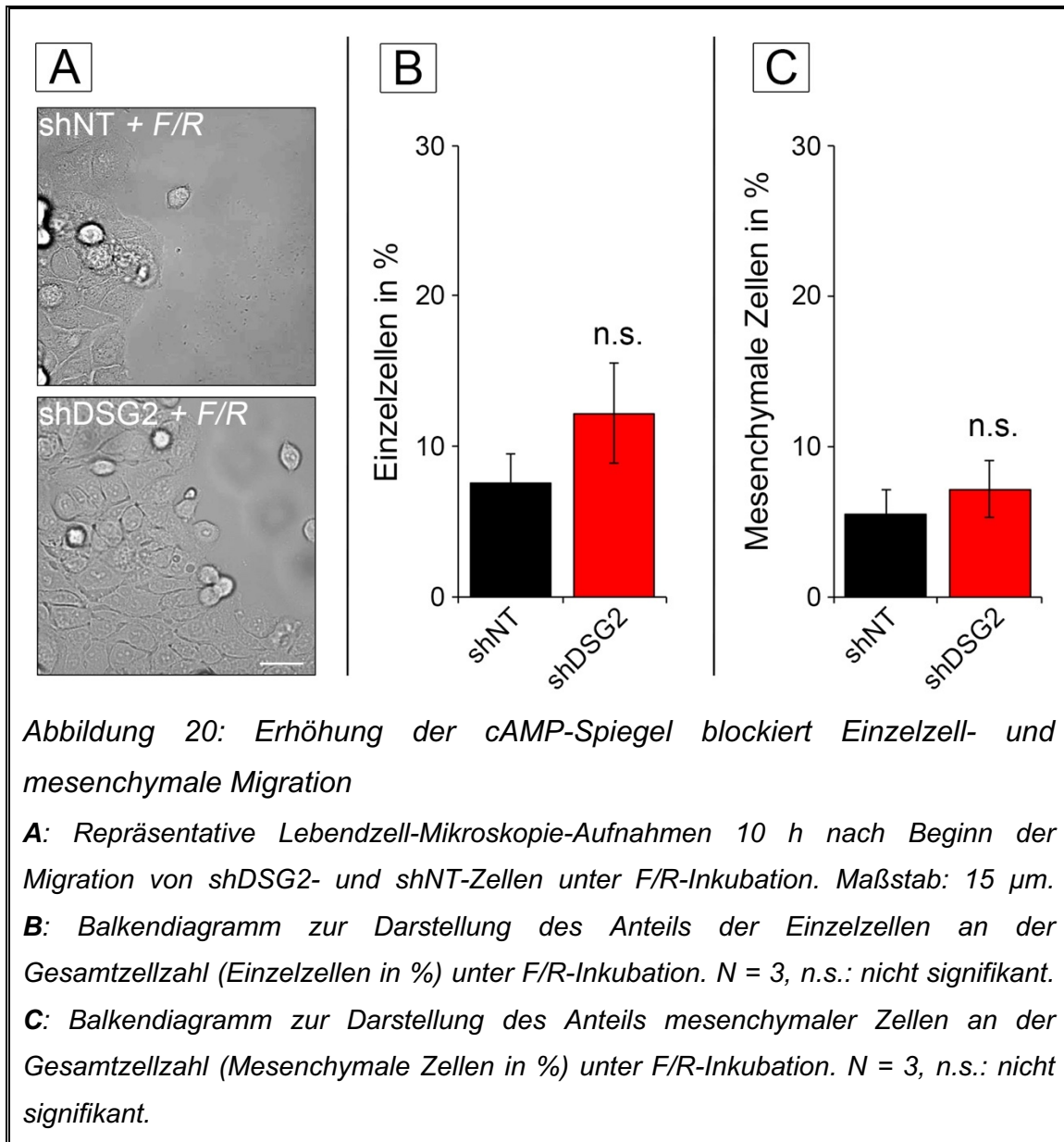
Zuerst wurde der Einfluss einer cAMP-Spiegel-Erhöhung auf die Migration getestet. Hierfür wurden analog zu 3.2.1 Migrations-Assays durchgeführt. Wie in Abbildung 19 dargestellt, wurde durch die Behandlung mit F/R die Migration stark reduziert.



Während der deutliche promigratorische Effekt des DSG2-Knockdowns unter Kontrollbedingungen erneut gezeigt werden konnte, konnten weder die shNT- noch die shDSG2-Zellen unter F/R-Behandlung die Wundfläche innerhalb von 24 h schließen. Zudem konnte unter den mit F/R inkubierten Zellen zwischen Knock-down und Kontrolle kein signifikanter Unterschied mehr nachgewiesen werden. Daraus lässt sich folgern, dass eine Erhöhung der cAMP-Spiegel mit F/R zu einer vollständigen Blockade des promigratorischen Effekts des DSG2-Knockdowns führt. Darüber hinaus verringerte die F/R Behandlung die Migration der Kontrollzellen ebenfalls signifikant. Dies spricht dafür, dass cAMP zusätzlich DSG2-unabhängig die Migration moduliert.

3.3.2 Erhöhung der cAMP-Spiegel stellt epithelialen Phänotyp wieder her

Nachdem in 3.2.3 gezeigt wurde, dass ein DSG2-Verlust zu einer Reduktion des epithelialen Phänotyps führt und cAMP in der Lage ist, die Migration zu inhibieren, wurde untersucht, ob eine cAMP-Erhöhung auch den verstärkt mesenchymalen Phänotyp der DSG2-Knockdown Zellen reduziert. Hierfür wurden erneut Lebendzell-Mikroskopie Versuche durchgeführt, die Zellen nach 10 h nach Migrationsbeginn phänotypisch charakterisiert und der Anteil an migrierenden Einzelzellen bestimmt. Die Zellen wurden für die gesamte Dauer der Migration mit F/R inkubiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen DSG2-Knockdown und shNT Zellen (Abbildung 20). Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen blockierte somit neben der reinen Migrationsgeschwindigkeit auch den Verlust des epithelialen Phänotyps in DSG2-defizienten Zellen.



3.3.3 Erhöhung der cAMP-Spiegel blockiert ERK-Aktivierung

Im nächsten Schritt wurden die molekularen Mechanismen dieser cAMP-vermittelten Effekte genauer untersucht. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Hütz et al., 2017) gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von ERK1/2 mit dem Inhibitor U0126 ähnlich zu einer cAMP-Spiegel-Erhöhung die Migration verringert, wurde in diesem Experiment untersucht, ob die Aktivierung von ERK1/2 durch cAMP beeinflusst werden kann. Hierzu wurden die Zellen für 4 h mit F/R inkubiert und anschließend nach dem Standardprotokoll lysiert und mittels Western-Blot analog zu 3.2.4.2 auf die Aktivierung von ERK1/2 getestet (siehe Abbildung 21). Diese Analysen zeigten eine signifikante Verringerung der basal erhöhten ERK1/2-Aktivität in DSG2-Knockdown-Zellen. Zwischen F/R-inkubierten Kontrollzellen und

F/R-inkubierten DSG2-Knockdown-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden. Folglich ist cAMP in ausreichend hoher intrazellulärer Konzentration in der Lage, die durch einen DSG2-Verlust ausgelöste ERK1/2-Aktivierung zu blockieren.

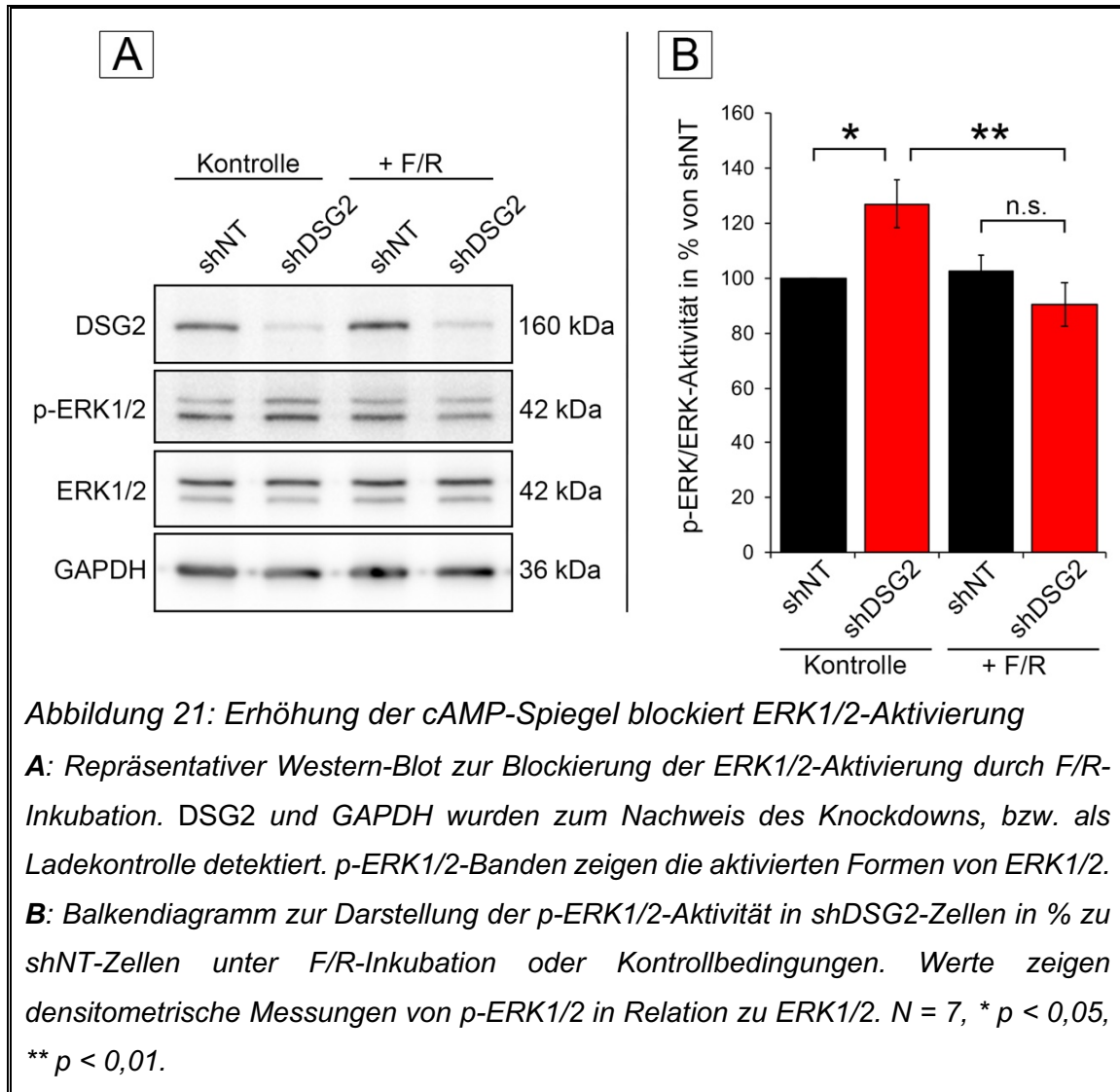


Abbildung 21: Erhöhung der cAMP-Spiegel blockiert ERK1/2-Aktivierung

A: Repräsentativer Western-Blot zur Blockierung der ERK1/2-Aktivierung durch F/R-Inkubation. DSG2 und GAPDH wurden zum Nachweis des Knockdowns, bzw. als Ladekontrolle detektiert. p-ERK1/2-Banden zeigen die aktivierten Formen von ERK1/2.

B: Balkendiagramm zur Darstellung der p-ERK1/2-Aktivität in shDSG2-Zellen in % zu shNT-Zellen unter F/R-Inkubation oder Kontrollbedingungen. Werte zeigen densitometrische Messungen von p-ERK1/2 in Relation zu ERK1/2. N = 7, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.3.4 DSG2-Verlust führt zur Erhöhung der basalen cAMP-Spiegel

Zusammenfassend konnte in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden, dass eine künstliche cAMP-Erhöhung zur Aufhebung der DSG2-Verlust-bedingten Migrationssteigerung, Reduktion des epithelialen Phänotyps und Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt. Um zu überprüfen, ob diese malignitätssteigernden Effekte möglicherweise durch eine basale Reduktion der cAMP-Spiegel in DSG2-Knockdown-Zellen vermittelt werden, wurden die cAMP-Spiegel mittels des cAMP-Immunoassays bestimmt. Entgegen der Hypothese, konnte gezeigt werden, dass ein DSG2-Verlust in den verwendeten Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der

basalen cAMP-Spiegel führt (Abbildung 22). Dies deutet an, dass der Verlust von DSG2 nicht über reduzierte cAMP-Spiegel zu verändertem zellulären Verhalten führt.

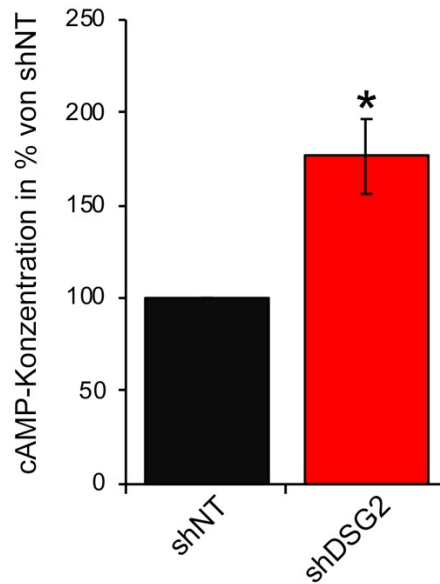


Abbildung 22: DSG2-Verlust führt zu erhöhten cAMP-Spiegeln

*Balkendiagramm zur Darstellung der intrazellulären cAMP-Konzentration von shDSG2-Zellen in % von shNT-Zellen. N = 4, * $p < 0,05$*

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ein verstärktes tumorigenes Verhalten sowie eine Aktivierung protoonkogener Signalwege in Pankreaskarzinom-Zellen als Reaktion auf den Verlust des desmosomalen Cadherins DSG2. Weiter konnten diese malignitätssteigernden Effekte durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel wieder verringert, bzw. gänzlich aufgehoben werden.

Interessanterweise wurden zudem basal erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel in DSG2-defizienten Zellen nachgewiesen.

4.1 Verlust von Desmoglein 2 führt zu malignerem Phänotyp in PDAC-Zellen

4.1.1 Verstärkung der Migration

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden verschiedene Knockout-Klone für DSG2 mittels CRISPR/Cas9 hergestellt und initial charakterisiert. Parallel wurden hierzu auch bereits bestehende DSG2-Knockdown-Klone verwendet. Für beide unterschiedlich generierten Zelllinien konnte unabhängig voneinander ein im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikanter Anstieg der Migration festgestellt werden. Dies unterstreicht die Validität der beschriebenen Beobachtungen und lässt einen von DSG2 unabhängigen durch Monoklonalität bedingten Zufallsbefund unwahrscheinlich erscheinen.

Generell ist der Wundheilungs-Assay eine in der Krebsforschung etablierte Methode für die Untersuchung des invasiven Potenzials von Karzinom-Zellen. So wird angenommen, dass eine erhöhte Zellmobilität die Basis für Invasion und Metastasierung darstellt, bzw. Invasion und Metastasierung gar durch die verstärkte Migration maligner Zellen initiiert werden (Li et al., 2011, Della Peruta et al., 2010).

In der Literatur wird eine verstärkte Migration von PDAC-Zellen mit der Aktivierung von bekannten tumorigenen Signalwegen, veränderten metabolischen Bedingungen und/oder Tumor-Stroma-Interaktionen in Verbindung gebracht (Hirakawa et al., 2016, Doi et al., 2012, Cao et al., 2016). Gemein ist all diesen Studien, dass eine verstärkte Migration stets mit erhöhter Malignität assoziiert wird. Weiter wird ein direkter Zusammenhang zwischen verstärkter Migration und

Invasion hergestellt (Su et al., 2009, Li et al., 2011), was abermals die Bedeutung der Migration für die Malignität des Pankreaskarzinoms unterstreicht.

Bezüglich der Rolle von Desmoglein 2 in der Migration von Zellen verschiedenster Gewebe gibt es unterschiedliche Beobachtungen. In einer Studie wurde gezeigt, dass eine verstärkte Migration von Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Haut mit einer Erhöhung der DSG2-Expression korreliert (Overmiller et al., 2016). Dem gegenüber beschreiben andere Studien, ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden, Arbeit eine Korrelation zwischen DSG2-Verlust und verstärkter Migration in verschiedenen physiologischen und maligne entarteten Geweben (McHarg et al., 2014, Al-Awadhi et al., 2017, Chen et al., 2011, Rieger-Christ et al., 2005). Da viele dieser Studien eine Steigerung der Migration und des DSG2-Verlusts verschiedensten teils bekannten tumorigenen Signalwegen (bspw. P38-MAPK) attribuieren, liegt die Vermutung nahe, dass eine Migrationssteigerung nicht alleine auf den Verlust reiner Zelladhäsion zurückzuführen ist (Cao et al., 2016, Lorch et al., 2007). So führt ein DSG2-Verlust in Melanom-Zellen zur Sekretion eines bis dato unbekannten chemotaktischen Lockstoffs, welcher konsekutiv die Migration steigert (Peitsch et al., 2014). Inwiefern Signalwege an der verstärkten Migration von DSG2-defizienten PDAC-Zellen beteiligt sind, soll unter anderem in Kapitel 4.2 genauer beleuchtet werden.

Eine Verbindung von DSG2 und der Migration in PDAC-Zellen wurde bisher nur einmal untersucht (Prasad and Katiyar, 2013). Dennoch stützen die Ergebnisse dieser Studie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Prasad und Katiyar zeigten, dass eine Behandlung von AsPC-1 Zellen mit spezifischen Proanthocyanidinen zur Verringerung der Migration und einer Steigerung der DSG2-Expression führt. Letztlich blieb bis zu den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnissen die Frage offen, ob ein initialer DSG2-Verlust in Pankreaskarzinom-Zellen zu einer verstärkten Migration führt und über welche Mechanismen dies vermittelt wird.

4.1.2 Reduktion des epithelialen Phänotyps

In Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen migrierender DSG2-Knockdown Zellen wurde der morphologische Phänotyp und die Motilität dieser Zellen mit den korrespondierenden Kontrollzellen verglichen. In den entstandenen Videos konnte eine deutliche Zunahme der Motilität in den Knockdown Zellen beobachtet werden, sowie eine Veränderung des Phänotyps hin zu einer verstärkt spindelförmigen

Morphologie eines Großteils der migrierenden Zellen. In der folgenden Quantifizierung wurden die Zellen je nach phänotypischen Merkmalen in zwei Gruppen (epithelial und mesenchymal) eingeteilt. In den DSG2-defizienten Zellen konnten hier ca. dreimal mehr mesenchymale Zellen gezählt werden, als in der Kontrollzelllinie. Dies deutete an, dass der Verlust von DSG2 zu einer Verstärkung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) führt.

Auf Basis dieser morphologisch-mikroskopischen Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Lena Sachs weitere molekularbiologische Experimente wie eine Transkriptomanalyse und eine q-PCR durchgeführt. Ziel war es, für mesenchymale Zellen charakteristische Proteine bzw. deren Transkripte (= mesenchymale Marker) nachzuweisen und somit die Hypothese zu stützen, dass ein DSG2-Verlust zu einer Verstärkung der EMT führen könnte. In diesen, in einem Kongressbeitrag („Desmoglein 2 regulates pancreatic cancer cell migration through modulation of cAMP levels” J. Zeiler, L. Sachs, V. Spindler (2017). Kongressbeitrag: “Experimental Biology” (Chicago, USA)) vorgestellten Daten, konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von DSG2 zu einer verstärkten Transkription und Translation bestimmter mesenchymaler Marker führt. Zusätzlich deutete die Transkriptomanalyse eine Herunterregulation zumindest einiger epithelialer Marker (u.a. CDH1, OCLN) an. In Abbildung 23 sind diese Ergebnisse bzw. die spezifischen Marker dargestellt. Interessanterweise fällt für jedes, der fünf in der q-PCR genauer untersuchten mesenchymalen Transkripte, die Hochregulation in den DSG2-Knockout Zellen stärker aus, als in den DSG2-Knockdown Zellen. Dies macht einen DSG2-spezifischen Effekt hochwahrscheinlich. Die in Abbildung 23 B gezeigten Transkripte zählen zu einer Vielzahl bekannter mesenchymaler Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen (Morimoto et al., 2017, Li et al., 2015, Moreno-Amador et al., 2018). Besonders hervorzuheben ist hierbei das Zinkfingerprotein Slug (= SNAI2). Dieses zählt zur Snail-Familie von Transkriptionsrepressoren, welche zu den wichtigsten EMT fördernden Proteinen gehören (Zhou et al., 2014). So wurde für Slug und Snail (= SNAI1, zusammen die bedeutendsten Vertreter der Snail-Familie) bereits mehrfach nachgewiesen, dass sie die Transkription verschiedener epithelialer Zelladhäsionsproteine wie Desmoglein 2 oder E-Cadherin (dem klassischen Cadherin in Adhärenskontakten) unterdrücken können (Liu et al., 2014, Kume et al., 2013, Kurrey et al., 2005). Der Abbau epithelialer Strukturen ist neben der

Expression von mesenchymalen Proteinen (z.B. Vimentin, N-Cadherin, Fibronectin, Slug) basaler Bestandteil der epithelial-mesenchymalen Transition (Thiery and Sleeman, 2006, Sun et al., 2012).

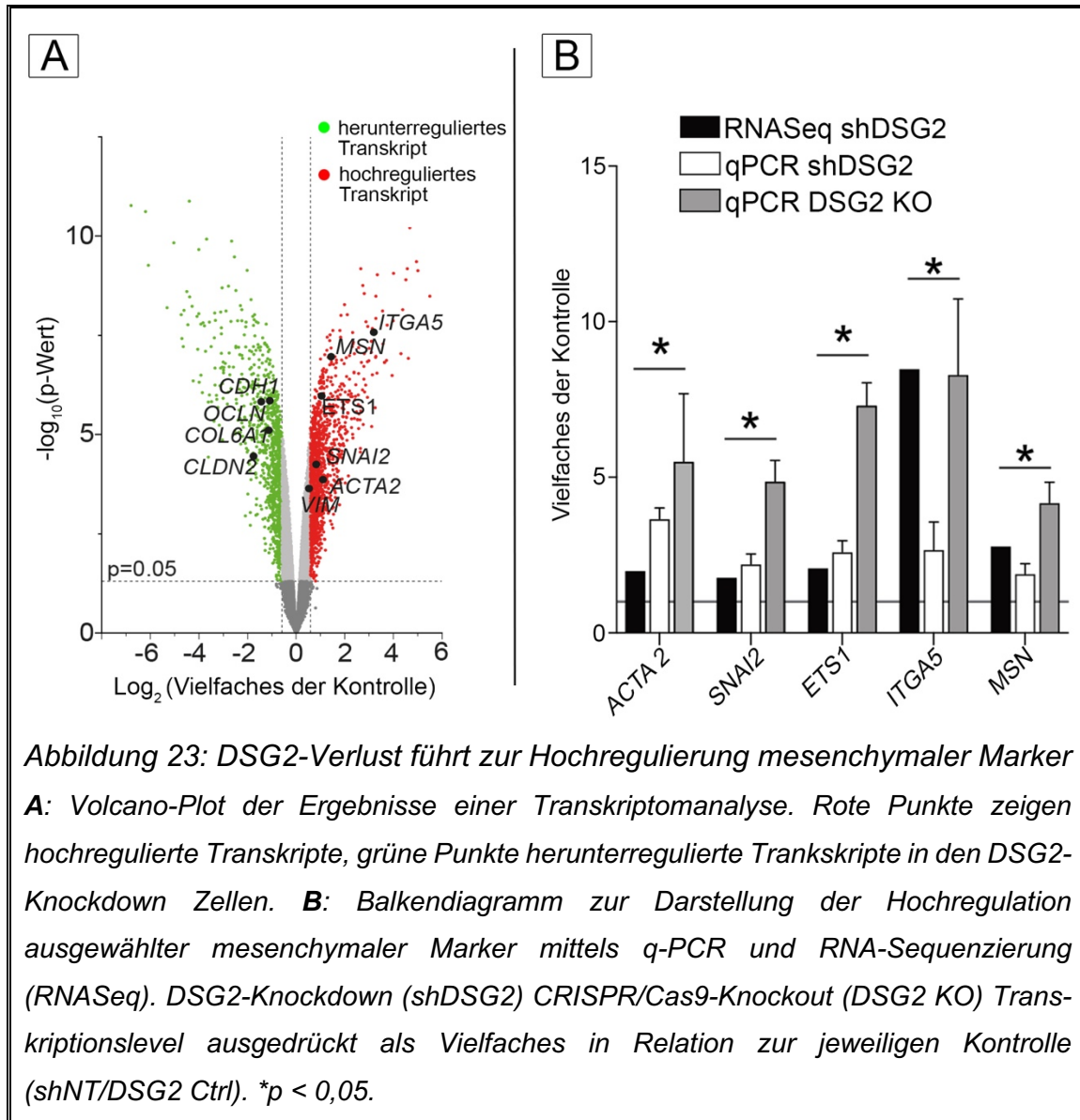


Abbildung 23: DSG2-Verlust führt zur Hochregulierung mesenchymaler Marker
A: Volcano-Plot der Ergebnisse einer Transkriptomanalyse. Rote Punkte zeigen hochregulierte Transkripte, grüne Punkte herunterregulierte Transkripte in den DSG2-Knockdown Zellen. **B:** Balkendiagramm zur Darstellung der Hochregulation ausgewählter mesenchymaler Marker mittels q-PCR und RNA-Sequenzierung (RNASeq). DSG2-Knockdown (shDSG2) CRISPR/Cas9-Knockout (DSG2 KO) Transkriptionslevel ausgedrückt als Vielfaches in Relation zur jeweiligen Kontrolle (shNT/DSG2 Ctrl). * $p < 0,05$.

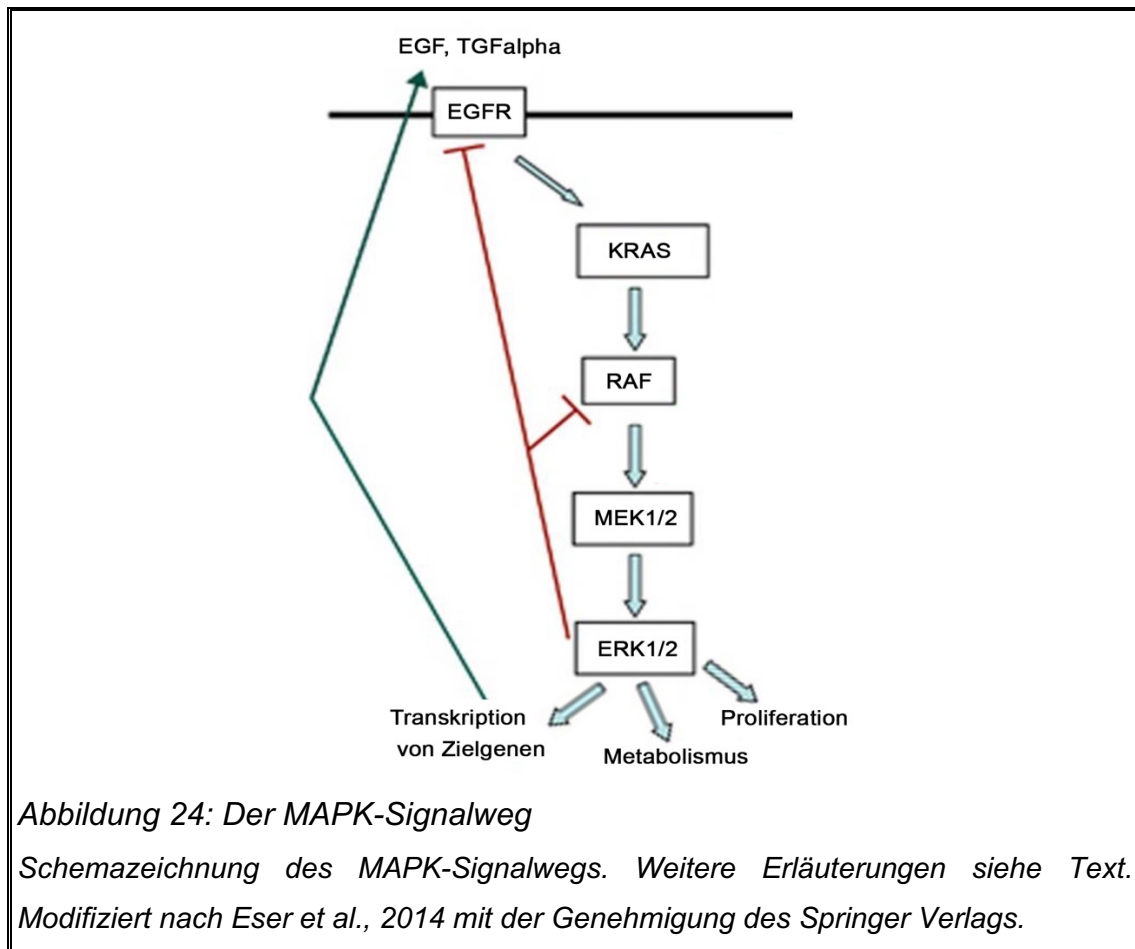
EMT wird, wie in der Fragestellung bereits beschrieben, oft als entscheidende Voraussetzung für die Invasion und Metastasierung epithelialer Tumore angesehen (Sato et al., 2015, Rhim et al., 2012, Russell et al., 2015). Dennoch zeigen zwei methodisch sehr aufwendige Studien, dass EMT weniger direkt die Metastasierung fördert, als Tumorzellen resistenter gegenüber zytostatischen Wirkstoffen macht (Fischer et al., 2015, Zheng et al., 2015). Letztlich besteht jedoch wenig Kontroverse über den negativen Einfluss verstärkter EMT auf das Überleben von Pankreaskarzinompatienten (Chen et al., 2014, Li et al., 2014,

Yamazaki et al., 2014). Zusammen verdeutlicht dies die Notwendigkeit eines genaueren molekularbiologischen Verständnisses der Effekte der epithelial-mesenchymalen Transition mit dem Ziel einer effektiven klinischen Inhibition. In der vorliegenden Arbeit konnte als Beitrag hierzu erstmals gezeigt werden, dass ein Verlust von DSG2 zur Erhöhung bestimmter mesenchymaler Marker sowie zur Reduktion des epithelialen Phänotyps in PDAC-Zellen führt.

4.2 Tumorigene Signalwege als Vermittler der DSG2 assoziierten Migrationssteigerung und Reduktion des epithelialen Phänotyps

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein DSG2-Verlust zu einer Verstärkung der Migration und Reduktion des epithelialen Phänotyps führt, galt es Signalwege zu untersuchen, die diese Effekte vermitteln könnten. Hierbei wurden verschiedenste Signalmoleküle untersucht. Für vier dieser an Migrationssteigerung und der Reduktion des epithelialen Phänotyps möglicherweise beteiligten Proteine konnten unterschiedliche Expressions- bzw. Aktivierungslevel zwischen DSG2-Knockdown und Kontrollzellen detektiert werden. In Folge des DSG2-Verlusts war die Expression von Plakoglobin verringert, während die Aktivierung von ERK1/2 (engl. extracellular signal-regulated kinase), EGFR (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR = HER1) und HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) gesteigert war.

ERK ist essenzieller Bestandteil des kanonischen MAPK-Signalwegs (engl. mitogen activated protein kinases). Dieser Signalweg kann unter anderem durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGFR und HER2 aktiviert werden. Der MAPK-Signalweg wiederum ist zentraler Bestandteil eines Netzwerks aus Signalwegen, das Proliferation, Differenzierung und zelluläres Überleben steuert (Hilger et al., 2002). Die Abbildung 24 zeigt vereinfacht die Komponenten dieses Netzwerks. Von EGFR ausgehend wird durch das G-Protein KRAS (siehe auch 1.1.3) eine Kaskade aus drei Kinasen aktiviert, Raf (MAP3K), MEK1/2 (MAP2K) und ERK1/2 (MAPK), welche die jeweils nachgeschaltete Kinase durch Phosphorylierung aktivieren, bzw. im Falle von ERK1/2 weitere Effektoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) aktivieren (Samatar and Poulikakos, 2014).



Der MAPK-Signalweg gilt als einer der am besten erforschten Signalwege überhaupt und seine Bestandteile sind in verschiedensten Krebsentitäten als potente Protoonkogene nachgewiesen worden (Santarpia et al., 2012). Beim Pankreaskarzinom sind sowohl die Wachstumsfaktor-Rezeptoren EGFR und HER2 als auch ERK1/2 für ihre Korrelation mit verringertem Patientenüberleben bekannt (Bian et al., 2015, Chadha et al., 2006, Kreutzer et al., 2012). Zu den dafür ursächlichen Mechanismen zählen unter anderem auch eine Aktivierung der EMT und die Förderung der Migration. So wurde für EGFR und HER2 mehrfach eine Verbindung zu EMT hergestellt und beispielsweise nachgewiesen, dass diese durch eine EGFR/HER2-Inhibition verringert werden kann (Thiery and Sleeman, 2006, Lorch et al., 2004, Carbone et al., 2015). In den beiden Studien von Thiery und Sleeman und Lorch et al. wurde die Induktion der EMT auch mit einer Verringerung der DSG2-Expression in Verbindung gebracht. Inwiefern ein DSG2-Verlust über eine Aktivierung von EGFR zu EMT führen kann, ist trotz dieser Studien nicht zweifelsfrei zu belegen. Dennoch scheint die Korrelation zwischen EGFR-Aktivierung, DSG2-Verlust und EMT sehr wahrscheinlich zu sein. Da Thiery

und Sleeman, sowie Lorch et al. die kausale Beeinflussung von DSG2 durch EGFR beschreiben, muss die Möglichkeit der Bidirektionalität, bzw. noch wahrscheinlicher eines übergeordneten Regulators genauer untersucht werden. Für ERK gibt es hingegen sowohl Hinweise für eine promigratorische Wirkung im Allgemeinen als auch speziell in Pankreaskarzinom-Zellen (Neuzillet et al., 2013, Su et al., 2009). So konnte in Experimenten unserer Arbeitsgruppe passend dazu eine Inhibition der Migration durch pharmakologische Inhibition von ERK1/2 beobachtet werden (Hütz et al., 2017). Ein direkter Zusammenhang zwischen einem DSG2-Verlust und einer ERK-Aktivierung in Pankreaskarzinom-Zellen ist bislang nicht bekannt. Auch der zugrundeliegende Mechanismus ist ungeklärt und in der Literatur verfügbare Daten kontrovers. So gibt es zwar Nachweise, dass Desmoglein 1 in Keratinozyten zu einer ERK-Inhibition führen kann (Harmon et al., 2013), aber auch Daten in Kolonepithel-Zellen, dass ein DSG2-Verlust über eine kompensatorische Erhöhung von DSC2 ERK inhibiert (Kamekura et al., 2014). Die Ursache dieser konträren Ergebnisse lässt sich mit derzeit vorhanden Daten nicht final beurteilen und sollte Ziel weiterführender Forschung sein.

Eine weitere Möglichkeit der Verstärkung der Migration durch den Knockdown von DSG2 könnte der Verlust von Plakoglobin sein. Dieses desmosomale Plaque-Protein ist einerseits bekannt für seine Beteiligung an verschiedenen teils tumorigenen Signalwegen (Aktary and Pasdar, 2012, Zhurinsky et al., 2000), andererseits auch für seinen migrations-hemmenden Effekt in Blasenkrebs-Zellen (Rieger-Christ et al., 2005). Darüber hinaus wurde in weiterführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass bei pharmakologischer ERK-Inhibition die Expression von Plakoglobin bei gleichbleibender DSG2-Expression ansteigt (Hütz et al., 2017). Dies könnte hinweisend sein für einen neuen, bislang unbekannten Signalweg, bei dem durch den Verlust von DSG2 und einer konsekutiven ERK-Aktivierung die verringerte Expression von Plakoglobin zu einer Verstärkung der Migration führt.

4.3 cAMP blockiert Migration und die Reduktion des epithelialen Phänotyps über ERK1/2- und Slug-Inhibitor

Cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) ist als wichtiger Signaltransduktor an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, sowie einigen pathologischen Mechanismen entscheidend beteiligt (Cooper et al., 1995). In der vorliegenden

Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine künstliche Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel mittels der Kombination aus Forskolin (Stimulation der Adenylylcyclase) und Rolipram (Hemmung der Phosphodiesterase 4) zu deutlich verringerter Migration und Erhöhung des epithelialen Phänotyps in Pankreaskarzinom-Zellen führt. Die durch den DSG2-Verlust vermittelte Steigerung der Migration und die Reduktion des epithelialen Phänotyps konnte dadurch vollständig rückgängig gemacht werden. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass cAMP die Überaktivierung von ERK1/2 durch den Verlust von DSG2 aufhebt.

Mögliche Ursache dieser Effekte könnte die Stärkung der interzellulären Adhäsion durch cAMP sein. So konnte in verschiedensten Geweben (Herz, Endothel, Haut) gezeigt werden, dass eine Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel die Zelladhäsion steigert und die Integrität der Endothelbarriere erhält (Spindler et al., 2010, Schinner et al., 2017, Spindler and Waschke, 2011).

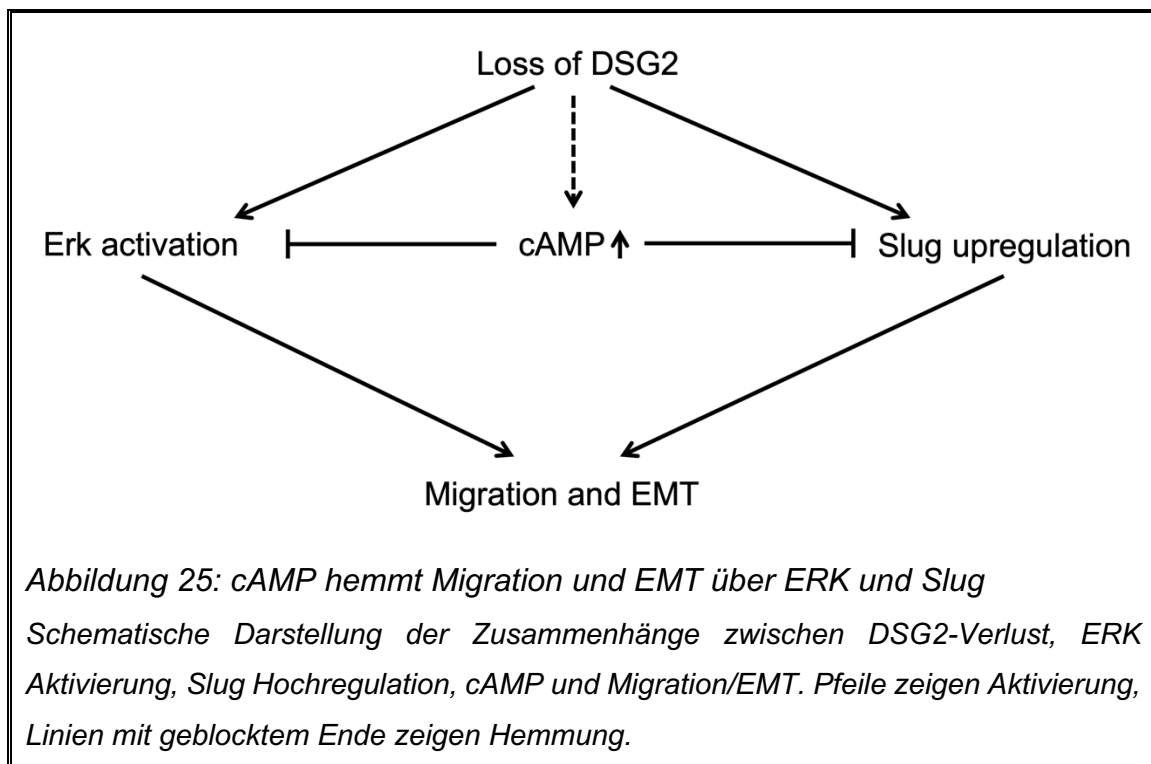
Speziell bezogen auf Migration und EMT in Pankreaskarzinom-Zellen werden in der Literatur jedoch bislang verschiedene andere Mechanismen postuliert. Zudem besteht hier eine gewisse Kontroverse über den genauen Effekt von cAMP bzw. dessen beider Haupteffektoren PKA (Proteinkinase A) und Epac1 (engl. exchange protein directly activated by cAMP). Während für PKA angenommen wird, dass eine Aktivierung, zum Beispiel durch eine Erhöhung der cAMP-Spiegel, zu einer Verminderung der Migration und EMT führt (Giacomelli et al., 2018, Zimmerman et al., 2015, Kim et al., 2009), werden Epac1 exakt gegenteilige Funktionen attribuiert (Almahariq et al., 2015). Besonders interessant sind die Ergebnisse der aktuellen Studie von Giacomelli et al., in welcher cAMP/PKA hemmend auf die EMT in alveolarem Epithel wirkt und MAPK/ERK diese verstärkt. Dies unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und schlägt einen Mechanismus vor, wie cAMP über eine Hemmung von ERK die EMT und Migration hemmen könnte.

Weiter gibt es Berichte über eine hemmende Interaktion zwischen PKA und Snail (MacPherson et al., 2010). Dazu passend konnte in weiterführenden bislang unpublizierten Experimenten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass eine F/R-vermittelte cAMP-Erhöhung zur Reduktion der Slug-Expression führt. Weiter bedingte eine Hemmung von Slug mittels siRNA (engl. small interfering RNA) eine Verringerung der Migration ähnlich einer ERK-Inhibition. Somit könnte

Slug neben ERK sowohl ein Mechanismus zur Steigerung von Migration und EMT durch den Verlust von DSG2, als auch Ziel der cAMP vermittelten Inhibition von Migration und EMT sein.

Letztendlich bleibt jedoch ungeklärt, über welche spezifischen Signaltransduktoren cAMP diese Inhibition vermittelt und welche Regulatoren bestimmen, wann PKA und wann Epac1 den zellulären Phänotyp definiert (Burdyga et al., 2013).

Abbildung 25 fasst die oben beschriebenen Erkenntnisse schematisch zusammen.



Die basale Erhöhung der cAMP-Spiegel durch den Verlust von DSG2 ist in der Abbildung durch einen gestrichelten Pfeil dargestellt. Dieses interessante Ergebnis lässt sich noch nicht final einordnen. Eine mögliche Vermutung ist, dass Pankreaskarzinom-Zellen kompensatorisch die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, um dem vorangegangenen Haftungsverlust durch den Knockdown von DSG2 entgegenzuwirken. Diese Erhöhung scheint allerdings nicht effektiv genug zu sein, sondern bedarf einer zusätzlichen künstlichen Steigerung, um die durch den Verlust von DSG2 hervorgerufenen Effekte aufzuheben. Eine ähnliche Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration als zellulärer - allerdings funktionell insuffizienter - Rettungsmechanismus nach einem Verlust von Zelladhäsion ist beispielsweise aus der Pemphigusforschung bekannt (Spindler and Waschke, 2011).

Letztendlich deuten diese Ergebnisse in der Gesamtheit darauf hin, dass cAMP die Malignität von Pankreaskarzinom-Zellen verringern könnte und daher ein vielversprechendes und möglicherweise therapeutisch beeinflussbares Ziel darstellt.

4.4 Ausblick

Neuesten Schätzungen zufolge soll das Pankreaskarzinom bis 2030 zur zweithäufigsten Krebstodesursache in den USA aufsteigen und wird damit auch sozioökonomisch eine gewaltige Herausforderung darstellen (Rahib et al., 2014). Dies verdeutlicht abermals den dringenden Bedarf nach einer zielgerichteten und effektiven systemischen Therapie, deren Grundlage das detaillierte molekularebiologische Verständnis dieser Krebsentität darstellt. Im Kontrast dazu ist die Rolle der Zelladhäsion und vor allem der desmosomalen Haftung für die Malignität des Pankreaskarzinoms nur schlecht erforscht. Die hier vorliegende Studie hat sich erstmals detailliert mit der Rolle des häufigsten desmosomalen Cadherins Desmoglein 2 befasst und Belege für einen Einfluss auf die tumorigenen Faktoren Migration und EMT gezeigt. Dennoch bleiben Punkte offen, die in weiterführender Forschung adressiert werden sollten. Zunächst sollte genauer auf die DSG2-Distribution innerhalb eines Tumors eingegangen werden. Die große intra- und intertumorale Heterogenität des Pankreaskarzinoms deutet darauf hin, dass DSG2 beispielsweise spezifisch an den Rändern des Tumors herunterreguliert sein könnte und somit Invasion und Metastasierung bedingt. In Einklang mit dieser Vermutung stehen zwei Studien, die einerseits zeigen, dass EMT in Pankreaskarzinomen hauptsächlich am Rand des Tumors auftritt (Kohler et al., 2015) und andererseits die globale DSG2-Expression nicht mit dem Patientenüberleben korreliert (Ormanns et al., 2015). Weiter sollte der Effekt eines DSG2-Verlusts in Pankreaskarzinom-Zellen auch in vivo untersucht werden. Spezieller Fokus sollte hierbei auf die Metastasierung DSG2-defizienter Zellen gelegt werden. Hier bietet sich speziell die Verwendung der in der vorliegenden Studie generierten CRISPR/Cas9 DSG2-Knockout Zellen an. Diese könnten ferner auch zur Validierung aller anderer in dieser Arbeit beschriebenen DSG2-abhängigen Effekte dienen. Als Brücke zwischen reinen 2D in vitro Versuchen und in vivo Metastasierungsmodellen könnten auch organotypische 3D-Modelle dienen. Abschließend sollten vor allem die von cAMP vermittelten protektiven

Effekte genauer beleuchtet werden. Auch wenn diese Studie erste Daten über die biochemischen Mechanismen der cAMP-vermittelten Inhibition von Migration und EMT zeigen konnte, bleiben vor allem Fragen zu den bekannten Effektormolekülen von cAMP offen. Ob und wie PKA und Epac1 die beobachteten phänotypischen Effekte von cAMP mediiieren, sollte unbedingt genauer untersucht werden. Dies ist die Grundvoraussetzung, um die protektiven Auswirkungen von cAMP klinisch nutzbar machen zu können.

5 Zusammenfassung

Das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC/Pankreaskarzinom) ist die tödlichste Krebserkrankung der westlichen Welt. Verantwortlich dafür ist eine Kombination aus Symptomarmut, aggressiver Metastasierung und Invasion, sowie sehr limitierter systemischer Therapierbarkeit. Leider sind die zugrundeliegenden Mechanismen bis heute wenig verstanden. Speziell die Rolle der desmosomalen Adhäsion ist in dieser Krebsentität relativ schlecht erforscht, obwohl deren Wichtigkeit für die Integrität epithelialer Gewebe unumstritten ist.

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle von Desmoglein 2 (DSG2), dem häufigsten desmosomalen Cadherin, für die Malignität von Pankreaskarzinom-Zellen *in vitro* studiert. Genutzt wurden hierfür eine DSG2-Knockdown- und eine für diese Studie völlig neu generierte DSG2-Knockout-Zelllinie (CRISPR/Cas9). Der Effekt eines DSG2-Verlusts auf die Malignität dieser Zellen wurde mittels einer Vielzahl morphologischer und biochemischer Methoden untersucht. Hierzu zählen Life-Cell-Imaging, Migrationsassays, Immunfluoreszenz-Konfokalmikroskopie, Westernblotting und weitere.

Der Verlust von DSG2 führte zu einer Zunahme der Migrationsfähigkeit der verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien. Weiter zeigten DSG2-defiziente Zellen ein reduziertes epitheliales Verhalten und migrierten auf Basis eines verstärkt mesenchymalen Phänotyps. Als Vermittler dieser Effekte konnten verschiedene Signalwegsmoleküle des kanonischen MAPK-Signalwegs identifiziert werden. So führte ein DSG2-Verlust zur Aktivierung von EGFR, HER2 und ERK, welche als potente Protoonkogene in der Krebsforschung bekannt sind. Sowohl die verstärkte Migration und EMT als auch die Aktivierung von ERK konnten in der Folge durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel mittels Inkubation mit Forskolin (Adenylylcyclase-Aktivator) und Rolipram (Phosphodiesterase-Hemmer) gänzlich aufgehoben werden. Dass DSG2-defiziente Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen überraschenderweise bereits basal erhöhte cAMP-Spiegel zeigten, könnte auf einen durch cAMP vermittelten endogenen Rettungsmechanismus hinweisen. So könnte die pharmakologische Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel eine vielversprechende Möglichkeit zur Reduktion des invasiven Verhaltens von Pankreaskarzinom-Zellen darstellen und sollte Gegenstand weiterführender Forschung sein.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A. & Maheswaran, S. 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158, 1110-1122.
- Adamska, A., Domenichini, A. & Falasca, M. 2017. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci*, 18, 1-43.
- Aktary, Z. & Pasdar, M. 2012. Plakoglobin: role in tumorigenesis and metastasis. *Int J Cell Biol*, 2012, 1-14.
- Al-Amoudi, A., Castano-Diez, D., Devos, D. P., Russell, R. B., Johnson, G. T. & Frangakis, A. S. 2011. The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6480-6485.
- Al-Amoudi, A., Norlen, L. P. & Dubochet, J. 2004. Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J Struct Biol*, 148, 131-135.
- Al-Awadhi, F. H., Salvador, L. A., Law, B. K., Paul, V. J. & Luesch, H. 2017. Kempopeptin C, a Novel Marine-Derived Serine Protease Inhibitor Targeting Invasive Breast Cancer. *Mar Drugs*, 15, 1-17.
- Almahariq, M., Chao, C., Mei, F. C., Hellmich, M. R., Patrikeev, I., Motamedi, M. & Cheng, X. 2015. Pharmacological inhibition and genetic knockdown of exchange protein directly activated by cAMP 1 reduce pancreatic cancer metastasis in vivo. *Mol Pharmacol*, 87, 142-149.
- Amagai, M. 2010. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86, 524-537.
- Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z. H., Andl, C. & Stanley, J. R. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med*, 6, 1275-1277.
- Amagai, M. & Stanley, J. R. 2012. Desmoglein as a target in skin disease and beyond. *J Invest Dermatol*, 132, 776-784.
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., Chin, V., Anderson, M. J., Kazakoff, S., Leonard, C., Newell, F., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wilson, P. J., Cloonan, N., Kassahn, K. S., Taylor, D., Quek, K., Robertson, A., Pantano, L., Mincarelli, L., Sanchez, L. N., Evers, L., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M. J., Jones, M. D., Colvin, E. K., Nagrial, A. M., Humphrey, E. S., Chantrill, L. A., Mawson, A., Humphris, J., Chou, A., Pajic, M., Scarlett, C. J., Pinho, A. V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J. S., Kench, J. G., Lovell, J. A., Merrett, N. D., Toon, C. W., Epari, K., Nguyen, N. Q., Barbour, A., Zeps, N., Moran-Jones, K., Jamieson, N. B., Graham, J. S., Duthie, F., Oien, K., Hair, J., Grutzmann, R., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Wolfgang, C. L., Morgan, R. A., Lawlor, R. T., Corbo, V., Bassi, C., Rusev, B., Capelli, P., Salvia, R., Tortora, G., Mukhopadhyay, D., Petersen, G. M., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Munzy, D. M., Fisher, W. E., Karim, S. A., Eshleman, J. R., Hruban, R. H., Pilarsky, C., Morton, J. P., Sansom, O. J.,

- Scarpa, A., Musgrove, E. A., Bailey, U. M., Hofmann, O., Sutherland, R. L., Wheeler, D. A., Gill, A. J., Gibbs, R. A., Pearson, J. V., et al. 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531, 47-52.
- Balda, M. 2003. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*, 13, 310-318.
- Barber, A. G., Castillo-Martin, M., Bonal, D. M., Rybicki, B. A., Christiano, A. M. & Cordon-Cardo, C. 2014. Characterization of desmoglein expression in the normal prostatic gland. Desmoglein 2 is an independent prognostic factor for aggressive prostate cancer. *PLoS One*, 9, 1-10.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. & Horvath, P. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315, 1709-1712.
- Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., Takaori, K., Terris, B., Yachida, S., Esposito, I., Furukawa, T. & Baltimore Consensus, M. 2015. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol*, 39, 1730-1741.
- Bazzi, H., Getz, A., Mahoney, M. G., Ishida-Yamamoto, A., Langbein, L., Wahl, J. K., 3rd & Christiano, A. M. 2006. Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. *Differentiation*, 74, 129-140.
- Bian, Y., Yu, Y., Wang, S. & Li, L. 2015. Up-regulation of fatty acid synthase induced by EGFR/ERK activation promotes tumor growth in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 463, 612-617.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W. & Brand-Saberi, B. 1996. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)*, 156, 217-226.
- Brennan, D. & Mahoney, M. G. 2009. Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas: A tissue-microarray based study. *Cell Adh Migr*, 3, 148-154.
- Breuninger, S., Reidenbach, S., Sauer, C. G., Strobel, P., Pfitzenmaier, J., Trojan, L. & Hofmann, I. 2010. Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas: implications for diagnosis and tumor progression. *Am J Pathol*, 176, 2509-2519.
- Broussard, J. A., Getsios, S. & Green, K. J. 2015. Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell Tissue Res*, 360, 501-512.
- Burdyga, A., Conant, A., Haynes, L., Zhang, J., Jalink, K., Sutton, R., Neoptolemos, J., Costello, E. & Tepikin, A. 2013. cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: effects of PKA and EPAC. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2664-2672.
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D. & Von Hoff, D. D. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, 15, 2403-2413.

- Busca, R., Pouyssegur, J. & Lenormand, P. 2016. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol*, 4, 1-23.
- Callery, M. P., Chang, K. J., Fishman, E. K., Talamonti, M. S., William Traverso, L. & Linehan, D. C. 2009. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol*, 16, 1727-1733.
- Cao, L., Chen, X., Xiao, X., Ma, Q. & Li, W. 2016. Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways. *Int J Oncol*, 49, 735-743.
- Carbone, C., Piro, G., Fassan, M., Tamburrino, A., Mina, M. M., Zanotto, M., Chiao, P. J., Bassi, C., Scarpa, A., Tortora, G. & Melisi, D. 2015. An angiopoietin-like protein 2 autocrine signaling promotes EMT during pancreatic ductal carcinogenesis. *Oncotarget*, 6, 13822-13834.
- Celentano, A., Mignogna, M. D., McCullough, M. & Cirillo, N. 2017. Pathophysiology of the Desmo-Adhesome. *J Cell Physiol*, 232, 496-505.
- Chadha, K. S., Khoury, T., Yu, J., Black, J. D., Gibbs, J. F., Kuvshinov, B. W., Tan, D., Brattain, M. G. & Javle, M. M. 2006. Activated Akt and Erk expression and survival after surgery in pancreatic carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 13, 933-939.
- Chen, J., O'Shea, C., Fitzpatrick, J. E., Koster, M. I. & Koch, P. J. 2012. Loss of Desmocollin 3 in skin tumor development and progression. *Mol Carcinog*, 51, 535-545.
- Chen, J., Xu, H., Zou, X., Wang, J., Zhu, Y., Chen, H., Shen, B., Deng, X., Zhou, A., Chin, Y. E., Rauscher, F. J., 3rd, Peng, C. & Hou, Z. 2014. Snail recruits Ring1B to mediate transcriptional repression and cell migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 74, 4353-4363.
- Chen, W. H., Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Shimano, T., Penetrante, R., Sanders, W. H., Berjian, R., Douglass, H. O., Martin, E. W. & Chu, T. M. 1982. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro*, 18, 24-34.
- Chen, Y. J., Lee, L. Y., Chao, Y. K., Chang, J. T., Lu, Y. C., Li, H. F., Chiu, C. C., Li, Y. C., Li, Y. L., Chiou, J. F. & Cheng, A. J. 2013. DSG3 facilitates cancer cell growth and invasion through the DSG3-plakoglobin-TCF/LEF-Myc/cyclin D1/MMP signaling pathway. *PLoS One*, 8, 1-13.
- Chen, Y. S., Mathias, R. A., Mathivanan, S., Kapp, E. A., Moritz, R. L., Zhu, H. J. & Simpson, R. J. 2011. Proteomics profiling of Madin-Darby canine kidney plasma membranes reveals Wnt-5a involvement during oncogenic H-Ras/TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Proteomics*, 10, 1-15.
- Chin, V., Nagrial, A., Sjoquist, K., O'Connor, C. A., Chantrill, L., Biankin, A. V., Scholten, R. J. & Yip, D. 2018. Chemotherapy and radiotherapy for advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, 1-165.
- Collisson, E. A., Trejo, C. L., Silva, J. M., Gu, S., Korkola, J. E., Heiser, L. M., Charles, R. P., Rabinovich, B. A., Hann, B., Dankort, D., Spellman, P. T., Phillips, W. A., Gray, J. W. & McMahon, M. 2012. A central role for RAF-->MEK-->ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov*, 2, 685-693.
- Cooper, D. M., Mons, N. & Karpen, J. W. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*, 374, 421-424.

- Deer, E. L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Firpo, M. A. & Mulvihill, S. J. 2010. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39, 425-435.
- Della Peruta, M., Giagulli, C., Laudanna, C., Scarpa, A. & Sorio, C. 2010. RHOA and PRKCZ control different aspects of cell motility in pancreatic cancer metastatic clones. *Mol Cancer*, 9, 1-8.
- Delmar, M. & McKenna, W. J. 2010. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res*, 107, 700-714.
- Delva, E., Tucker, D. K. & Kowalczyk, A. P. 2009. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, 1-17.
- Demirag, G. G., Sullu, Y. & Yucel, I. 2012. Expression of Plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers. *Med Oncol*, 29, 1518-1522.
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., Funakoshi, A., Wakasugi, H., Asano, T., Hishinuma, S., Ogata, Y., Sunamura, M., Yamaguchi, K., Tanaka, M., Takao, S., Aikou, T., Hirata, K., Maguchi, H., Aiura, K., Aoki, T., Kakita, A., Sasaki, M., Ozaki, M., Matsusue, S., Higashide, S., Noda, H., Ikeda, S., Maetani, S., Yoshida, S. & Japan Pancreatic Cancer Study, G. 2008. Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today*, 38, 1021-1028.
- Doi, Y., Yashiro, M., Yamada, N., Amano, R., Noda, S. & Hirakawa, K. 2012. VEGF-A/VEGFR-2 signaling plays an important role for the motility of pancreas cancer cells. *Ann Surg Oncol*, 19, 2733-2743.
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1-9.
- Dubash, A. D. & Green, K. J. 2011. Desmosomes. *Curr Biol*, 21, 529-531.
- Dusek, R. L., Godsel, L. M. & Green, K. J. 2007. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *J Dermatol Sci*, 45, 7-21.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G. & Saur, D. 2014. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 111, 817-822.
- Fauci, A. S. & Harrison, T. R. 2008. *Harrison's principles of internal medicine*, New York, McGraw-Hill.
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V. & Gao, D. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527, 472-476.
- Garrod, D. & Chidgey, M. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 572-587.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J. & Nie, Z. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 537-545.
- Getsios, S., Huen, A. C. & Green, K. J. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 271-281.
- Giacomelli, C., Daniele, S., Romei, C., Tavanti, L., Neri, T., Piano, I., Celi, A., Martini, C. & Trincavelli, M. L. 2018. The A2B Adenosine Receptor Modulates the Epithelial- Mesenchymal Transition through the Balance of cAMP/PKA and MAPK/ERK Pathway Activation in Human Epithelial Lung Cells. *Front Pharmacol*, 9, 1-18.
- Graw, J. 2015. *Genetik*, Berlin, Springer Spektrum.

- Green, K. J., Jaiganesh, A. & Broussard, J. A. 2019. Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Res*, 8, 1-16.
- Gross, A., Pack, L. A. P., Schacht, G. M., Kant, S., Ungewiss, H., Meir, M., Schlegel, N., Preisinger, C., Boor, P., Guldiken, N., Krusche, C. A., Sellge, G., Trautwein, C., Waschke, J., Heuser, A., Leube, R. E. & Strnad, P. 2018. Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunol*, 11, 1630-1639.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 1, 474-483.
- Hamidov, Z., Altendorf-Hofmann, A., Chen, Y., Settmacher, U., Petersen, I. & Knosel, T. 2011. Reduced expression of desmocollin 2 is an independent prognostic biomarker for shorter patients survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 64, 990-994.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Harmon, R. M., Simpson, C. L., Johnson, J. L., Koetsier, J. L., Dubash, A. D., Najor, N. A., Sarig, O., Sprecher, E. & Green, K. J. 2013. Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *J Clin Invest*, 123, 1556-1570.
- Harrison, O. J., Brasch, J., Lasso, G., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Honig, B. & Shapiro, L. 2016. Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 7160-7165.
- Hartlieb, E., Kempf, B., Partilla, M., Vigh, B., Spindler, V. & Waschke, J. 2013. Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. *PLoS One*, 8, 1-12.
- Herbst, R. S. & Shin, D. M. 2002. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*, 94, 1593-1611.
- Hilger, R. A., Scheulen, M. E. & Strumberg, D. 2002. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*, 25, 511-518.
- Hirakawa, T., Yashiro, M., Doi, Y., Kinoshita, H., Morisaki, T., Fukuoka, T., Hasegawa, T., Kimura, K., Amano, R. & Hirakawa, K. 2016. Pancreatic Fibroblasts Stimulate the Motility of Pancreatic Cancer Cells through IGF1/IGF1R Signaling under Hypoxia. *PLoS One*, 11, 1-14.
- Huber, O. & Petersen, I. 2015. 150th Anniversary Series: Desmosomes and the Hallmarks of Cancer. *Cell Commun Adhes*, 22, 15-28.
- Hütz, K., Zeiler, J., Sachs, L., Ormanns, S. & Spindler, V. 2017. Loss of desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*, 56, 1884-1895.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. 1987. Nucleotide Sequence of the iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia coli, and Identification of the Gene Product. *J Bacteriol*, 169, 5429-5433.
- Jansen, R., Embden, J., Gastra, W. & LM, S. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 43(6), 1565-1575.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-1428.

- Kamekura, R., Kolegraff, K. N., Nava, P., Hilgarth, R. S., Feng, M., Parkos, C. A. & Nusrat, A. 2014. Loss of the desmosomal cadherin desmoglein-2 suppresses colon cancer cell proliferation through EGFR signaling. *Oncogene*, 33, 4531-4536.
- Kim, A., Son, M., Kim, K. I., Yang, Y., Song, E. Y., Lee, H. G. & Lim, J. S. 2009. Elevation of intracellular cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated thymosin beta4 expression in melanoma cells. *Exp Cell Res*, 315, 3325-3335.
- Kohler, I., Bronsert, P., Timme, S., Werner, M., Brabletz, T., Hopt, U. T., Schilling, O., Bausch, D., Keck, T. & Wellner, U. F. 2015. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 30 Suppl 1, 78-84.
- Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2004-2021.
- Kowalczyk, A. P. & Green, K. J. 2013. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, 95-118.
- Krebsregister 2017. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*, Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Kreutzer, J. N., Salvador, A., Diana, P., Cirrincione, G., Vedaldi, D., Litchfield, D. W., Issinger, O. G. & Guerra, B. 2012. 2-Triazenoazaindoles: alpha novel class of triazenes inducing transcriptional down-regulation of EGFR and HER-2 in human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*, 40, 914-922.
- Kume, K., Haraguchi, M., Hijioka, H., Ishida, T., Miyawaki, A., Nakamura, N. & Ozawa, M. 2013. The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 889-894.
- Kurrey, N. K., K, A. & Bapat, S. A. 2005. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol Oncol*, 97, 155-165.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Leitlinienprogramm-Onkologie 2013. *S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreas-karzinom*, Berlin, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF.
- Li, A., Morton, J. P., Ma, Y., Karim, S. A., Zhou, Y., Faller, W. J., Woodham, E. F., Morris, H. T., Stevenson, R. P., Juin, A., Jamieson, N. B., MacKay, C. J., Carter, C. R., Leung, H. Y., Yamashiro, S., Blyth, K., Sansom, O. J. & Machesky, L. M. 2014. Fascin is regulated by slug, promotes progression of pancreatic cancer in mice, and is associated with patient outcomes. *Gastroenterology*, 146, 1-17.
- Li, W., Ma, Q., Li, J., Guo, K., Liu, H., Han, L. & Ma, G. 2011. Hyperglycemia enhances the invasive and migratory activity of pancreatic cancer cells via hydrogen peroxide. *Oncol Rep*, 25, 1279-1287.
- Li, Z., Liu, Z., Dong, S., Zhang, J., Tan, J., Wang, Y., Ge, C., Li, R., Xue, Y., Li, M., Wang, W., Xiang, X., Yang, J., Ding, H., Geng, T., Yao, K. & Song, X. 2015. miR-506 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Angiogenesis in Gastric Cancer. *Am J Pathol*, 185, 2412-2420.
- Liu, M. X., Zhou, K. C. & Cao, Y. 2014. MCRS1 overexpression, which is specifically inhibited by miR-129*, promotes the epithelial-mesenchymal

- transition and metastasis in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 13, 1-15.
- Lorch, J. H., Klessner, J., Park, J. K., Getsios, S., Wu, Y. L., Stack, M. S. & Green, K. J. 2004. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, 279, 37191-37200.
- Lorch, J. H., Thomas, T. O. & Schmoll, H. J. 2007. Bortezomib inhibits cell-cell adhesion and cell migration and enhances epidermal growth factor receptor inhibitor-induced cell death in squamous cell cancer. *Cancer Res*, 67, 727-734.
- Lüllmann-Rauch, R. 2015. *Taschenbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme.
- MacPherson, M. R., Molina, P., Souchelnytskyi, S., Wernstedt, C., Martin-Perez, J., Portillo, F. & Cano, A. 2010. Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol Biol Cell*, 21, 244-253.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 1:7, 1-26.
- McHarg, S., Hopkins, G., Lim, L. & Garrod, D. 2014. Down-regulation of desmosomes in cultured cells: the roles of PKC, microtubules and lysosomal/proteasomal degradation. *PLoS One*, 9, 1-14.
- Moffitt, R. A., Marayati, R., Flate, E. L., Volmar, K. E., Loeza, S. G., Hoadley, K. A., Rashid, N. U., Williams, L. A., Eaton, S. C., Chung, A. H., Smyla, J. K., Anderson, J. M., Kim, H. J., Bentrem, D. J., Talamonti, M. S., Iacobuzio-Donahue, C. A., Hollingsworth, M. A. & Yeh, J. J. 2015. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*, 47, 1168-1178.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W. & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. 2007. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, 25, 1960-1966.
- Moreno-Amador, J. L., Tellez, N., Marin, S., Aloy-Reverte, C., Semino, C., Nacher, M. & Montanya, E. 2018. Epithelial to mesenchymal transition in human endocrine islet cells. *PLoS One*, 13, 1-18.
- Morimoto, A., Kannari, M., Tsuchida, Y., Sasaki, S., Saito, C., Matsuta, T., Maeda, T., Akiyama, M., Nakamura, T., Sakaguchi, M., Nameki, N., Gonzalez, F. J. & Inoue, Y. 2017. An HNF4alpha-microRNA-194/192 signaling axis maintains hepatic cell function. *J Biol Chem*, 292, 10574-10585.
- Mühlhardt, C. 2013. *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics*, Berlin, Springer Spektrum.
- Neuzillet, C., Hammel, P., Tijeras-Raballand, A., Couvelard, A. & Raymond, E. 2013. Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev*, 32, 147-162.

- Oettle, H., Bauernhofer, T., Borner, M., Faber, G., Fietkau, R., Heinemann, V., Neumann, U. P., Pritzkuleit, R., Sinn, M., Waldschmidt, D. T. & Wörmann, B. 2018. *Leitlinie Pankreaskarzinom*, Berlin, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zulke, C., Fahlke, J., Arning, M. B., Sinn, M., Hinke, A. & Riess, H. 2013. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*, 310, 1473-1481.
- Ormanns, S., Altendorf-Hofmann, A., Jackstadt, R., Horst, D., Assmann, G., Zhao, Y., Bruns, C., Kirchner, T. & Knosel, T. 2015. Desmogleins as prognostic biomarkers in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*, 113, 1460-1466.
- Ottendorf, N. A., de Wilde, R. F., Maitra, A., Hruban, R. H. & Offerhaus, G. J. 2011. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Patholog Res Int*, 2011, 1-16.
- Overmiller, A. M., McGuinn, K. P., Roberts, B. J., Cooper, F., Brennan-Crispi, D. M., Deguchi, T., Peltonen, S., Wahl, J. K., 3rd & Mahoney, M. G. 2016. c-Src/Cav1-dependent activation of the EGFR by Dsg2. *Oncotarget*, 7, 37536-37555.
- Peitsch, W. K., Doerflinger, Y., Fischer-Colbrie, R., Huck, V., Bauer, A. T., Utikal, J., Goerdts, S. & Schneider, S. W. 2014. Desmoglein 2 depletion leads to increased migration and upregulation of the chemoattractant secretoneurin in melanoma cells. *PLoS One*, 9, 1-15.
- Prasad, R. & Katiyar, S. K. 2013. Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF-kappaB. *Cancer Lett*, 334, 118-126.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, 11, 761-774.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M. & Matrisian, L. M. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 74, 2913-2921.
- Ramani, V. C., Hennings, L. & Haun, R. S. 2008. Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 8, 1-10.
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G. L., Rustgi, A. K., Vonderheide, R. H., Leach, S. D. & Stanger, B. Z. 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148, 349-361.
- Rieger-Christ, K. M., Ng, L., Hanley, R. S., Durrani, O., Ma, H., Yee, A. S., Libertino, J. A. & Summerhayes, I. C. 2005. Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. *Br J Cancer*, 92, 2153-2159.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T. & Eliceiri, K. W. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18, 1-26.
- Russell, R., Perkhofer, L., Liebau, S., Lin, Q., Lechel, A., Feld, F. M., Hessmann, E., Gaedcke, J., Guthle, M., Zenke, M., Hartmann, D., von Figura, G., Weissinger, S. E., Rudolph, K. L., Moller, P., Lennerz, J. K., Seufferlein, T.,

- Wagner, M. & Kleger, A. 2015. Loss of ATM accelerates pancreatic cancer formation and epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun*, 6, 1-16.
- Salic, A. & Mitchison, T. J. 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2415–2420.
- Samatar, A. A. & Poulikakos, P. I. 2014. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 928-942.
- Santarpia, L., Lippman, S. M. & El-Naggar, A. K. 2012. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16, 103-119.
- Satoh, K., Hamada, S. & Shimosegawa, T. 2015. Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol*, 50, 140-146.
- Saung, M. T. & Zheng, L. 2017. Current Standards of Chemotherapy for Pancreatic Cancer. *Clin Ther*, 39, 2125-2134.
- Schafer, S., Koch, P. J. & Franke, W. W. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res*, 211, 391-399.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-682.
- Schinner, C., Vielmuth, F., Rotzer, V., Hiermaier, M., Radeva, M. Y., Co, T. K., Hartlieb, E., Schmidt, A., Imhof, A., Messoudi, A., Horn, A., Schlipp, A., Spindler, V. & Waschke, J. 2017. Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circ Res*, 120, 1305-1317.
- Schlegel, N., Meir, M., Heupel, W. M., Holthofer, B., Leube, R. E. & Waschke, J. 2010. Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298, 774-783.
- Schule, S., Neuhauser, C., Rauchfuss, F., Knosel, T., Settmacher, U. & Altendorf-Hofmann, A. 2014. The influence of desmocollin 1-3 expression on prognosis after curative resection of colorectal liver metastases. *Int J Colorectal Dis*, 29, 9-14.
- Seufferlein, T., Porzner, M., Heinemann, V., Tannapfel, A., Stuschke, M. & Uhl, W. 2014. Ductal pancreatic adenocarcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 111, 396-402.
- Shapiro, L. & Weis, W. I. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, 1-15.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68, 7-30.
- Singh, M. & Maitra, A. 2007. Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications. *Pancreatology*, 7, 9-19.
- Sleeman, J. P., Christofori, G., Fodde, R., Collard, J. G., Berx, G., Decraene, C. & Ruegg, C. 2012. Concepts of metastasis in flux: the stromal progression model. *Semin Cancer Biol*, 22, 174-186.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Frovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.

- Spindler, V., Vielmuth, F., Schmidt, E., Rubenstein, D. S. & Waschke, J. 2010. Protective endogenous cyclic adenosine 5'-monophosphate signaling triggered by pemphigus autoantibodies. *J Immunol*, 185, 6831-6838.
- Spindler, V. & Waschke, J. 2011. Beta-adrenergic stimulation contributes to maintenance of endothelial barrier functions under baseline conditions. *Microcirculation*, 18, 118-127.
- Spindler, V. & Waschke, J. 2014. Desmosomal cadherins and signaling: lessons from autoimmune disease. *Cell Commun Adhes*, 21, 77-84.
- Stahley, S. N. & Kowalczyk, A. P. 2015. Desmosomes in acquired disease. *Cell Tissue Res*, 360, 439-456.
- Su, F., Li, H., Yan, C., Jia, B., Zhang, Y. & Chen, X. 2009. Depleting MEKK1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human pancreatic cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 1655-1663.
- Sun, Q., Prasad, R., Rosenthal, E. & Katiyar, S. K. 2012. Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasiveness of human HNSCC cells by targeting EGFR and reversing the epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*, 7, 1-9.
- Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-142.
- Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S. & Garrod, D. R. 2010. Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J*, 429, 419-433.
- Tselepis, C., Chidgey, M., North, A. & Garrod, D. 1998. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8064-8069.
- Vila, M. R., Lloreta, J., Schussler, M. H., Berrozpe, G., Welt, S. & Real, F. X. 1995. New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab Invest*, 72, 395-404.
- Wang, J., Hollingshead, J., El-Masry, N., Horncastle, D., Talbot, I., Tomlinson, I., Alison, M. R. & El-Bahrawy, M. 2012. Expression of EGFR, HER2, phosphorylated ERK and phosphorylated MEK in colonic neoplasms of familial adenomatous polyposis patients. *J Gastrointest Cancer*, 43, 444-455.
- Wang, Q., Peng, D., Zhu, S., Chen, Z., Hu, T., Soutto, M., Saad, R., Zhang, S. & Ei-Rifai, W. 2014. Regulation of Desmocollin3 Expression by Promoter Hypermethylation is Associated with Advanced Esophageal Adenocarcinomas. *J Cancer*, 5, 457-464.
- Waschke, J. 2008. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, 130, 21-54.
- Wee, P. & Wang, Z. 2017. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*, 9, 1-45.
- Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J. N. & Thorpe, G. H. G. 1979. Analytical Luminescence: Its Potential in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*, 25, 1531-1546.
- Wong, M. P., Cheang, M., Yorida, E., Coldman, A., Gilks, C. B., Huntsman, D. & Berean, K. 2008. Loss of desmoglein 1 expression associated with worse prognosis in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Pathology*, 40, 611-616.
- Yamazaki, K., Masugi, Y., Effendi, K., Tsujikawa, H., Hiraoka, N., Kitago, M., Shinoda, M., Itano, O., Tanabe, M., Kitagawa, Y. & Sakamoto, M. 2014. Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and

- predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest*, 94, 683-691.
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A. & DePinho, R. A. 2016. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 30, 355-385.
- Yulis, M., Quiros, M., Hilgarth, R., Parkos, C. A. & Nusrat, A. 2018. Intracellular Desmoglein-2 cleavage sensitizes epithelial cells to apoptosis in response to pro-inflammatory cytokines. *Cell Death Dis*, 9, 1-13.
- Zetter, B. R. 1993. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*, 4, 219-229.
- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C. C., LeBleu, V. S. & Kalluri, R. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527, 525-530.
- Zhou, W., Lv, R., Qi, W., Wu, D., Xu, Y., Liu, W., Mou, Y. & Wang, L. 2014. Snail contributes to the maintenance of stem cell-like phenotype cells in human pancreatic cancer. *PLoS One*, 9, 1-11.
- Zhurinsky, J., Shtutman, M. & Ben-Ze'ev, A. 2000. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*, 113 (Pt 18), 3127-3139.
- Zimmerman, N. P., Roy, I., Hauser, A. D., Wilson, J. M., Williams, C. L. & Dwinell, M. B. 2015. Cyclic AMP regulates the migration and invasion potential of human pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*, 54, 203-215.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progression präkanzeröser Läsionen zum invasiven Karzinom	3
Abbildung 2: Schema und Ultrastruktur eines Desmosoms	6
Abbildung 3: Plasmidkarte CRISPR/Cas9	17
Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Charakterisierung von Wildtyp-Zelllinien	36
Abbildung 5: Vergleich DSG2-Distribution shRNA-Klone	37
Abbildung 6: Vergleich DSG2-Expression shRNA-Klone	38
Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese CRISPR/Cas9 Plasmide	39
Abbildung 8: Knockout Screening Western-Blot	40
Abbildung 9: Sanger-Sequenzierung der CRISPR/Cas9-Klone	41
Abbildung 10: CRISPR/Cas9 Knockout Klone DSG2 Immunfluoreszenz	42
Abbildung 11: DSG2-Knockout führt zu verstärkter Migration	43
Abbildung 12: DSG2-Verlust führt zu verstärkter Migration	44

Abbildung 13: DSG2-Verlust hat keinen Effekt auf Proliferation.....	45
Abbildung 14: DSG2-Verlust verstärkt Einzelzell- und mesenchymale Migration.....	46
Abbildung 15: DSG2-Verlust führt zu verringerter Plakoglobin Expression	47
Abbildung 16: DSG2-Verlust führt zu EGFR-Aktivierung.....	48
Abbildung 17: DSG2-Verlust führt zu HER2-Aktivierung	49
Abbildung 18: DSG2-Verlust führt zu ERK1/2-Aktivierung	50
Abbildung 19: Erhöhung der cAMP-Spiegel führt zu verringerter Migration	51
Abbildung 20: Erhöhung der cAMP-Spiegel blockiert Einzelzell- und mesenchymale Migration	53
Abbildung 21: Erhöhung der cAMP-Spiegel blockiert ERK1/2-Aktivierung	54
Abbildung 22: DSG2-Verlust führt zu erhöhten cAMP-Spiegeln.....	55
Abbildung 23: DSG2-Verlust führt zur Hochregulierung mesenchymaler Marker	59
Abbildung 24: Der MAPK-Signalweg	61
Abbildung 25: cAMP hemmt Migration und EMT über ERK und Slug	64

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete gentechnisch modifizierte Zellklone	13
Tabelle 2: Verwendete CRISPR/Cas9-Plasmide	17
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper	31
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper	32
Tabelle 5: Verwendete Mediatoren	33
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	33

6.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
bp	engl. base pairs (= Basenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	Kohlenstoff-Ende einer Peptidkette
Ca ²⁺	2-fach positiv geladenes Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosin-monophosphat
Cas	engl. CRISPR associated
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats
ctrl	engl. control (= Kontrolle)
d	Tage
d.h.	das heißt
DNA	engl. Deoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
DP	Desmoplakin
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
E-CAD	E-Cadherin
ECL	engl. enhanced chemiluminescence (= verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor (= epidermaler Wachstumsfaktor -Rezeptor)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
engl.	englisch
Epac1	engl. exchange protein directly activated by cAMP
ERK	engl. extracellular signal-regulated kinase
F/R	Forskolin/Rolipram
F _{ab}	engl. antigen binding fragment (= antigenbindendes Fragment)
F _c	engl. cristallisable fragment (= kristallisierbares Fragment)
FCS	Engl. fetal calf serum (= fötales Kälberserum)
g	Gramm
g	Ortsfaktor ($\approx 9,81\text{m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	engl. green fluorescent protein (= grün fluoreszierendes Protein)
gr.	griechisch
gRNA	engl. guide RNA
h	engl. hours (= Stunden)

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	engl. human epidermal growth factor receptor 2
i.d.R.	in der Regel
IF	Immunfluoreszenz
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	engl. knockout
L	Liter
LB	engl. lysogeny broth (Kulturmedium für Bakterien)
M	Molar (= mol/L)
mA	Milliampere
MAPK	engl. mitogen activated protein kinase (= mitogen-aktivierte Proteinkinase)
max.	maximal
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/L)
mm	Millimeter
mRNA	engl. messenger RNA
N-terminal	Stickstoff-Ende einer Peptidkette
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NGS	engl. normal goat serum (= normales Ziegenserum)
nm	Nanometer
nt	engl. non-target
OD	optische Dichte
p-	phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. phosphate buffered saline (= Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung)
PCA	engl. para-Cumaricacid (= para-Cumarsäure)
PDAC	engl. pancreatic ductal adenocarcinoma (= pankreatisches duktales Adenokarzinom)
PFA	Paraformaldehyd
PG	Plakoglobin
PKA	Proteinkinase A

q-PCR	engl. quantitative polymerase chain reaction (= quantitative Polymerasekettenreaktion)
RNA	engl. ribonucleic acid (= Ribonukleinsäure)
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
rpm	engl. rotations per minute (= Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	engl. standard error of the mean (= Standardfehler des Mittelwerts)
sgRNA	engl. single guide RNA
sh <i>DSG2</i>	gegen <i>DSG2</i> -mRNA gerichtete shRNA
shNT	engl. non-target shRNA
shRNA	engl. small hairpin RNA
siRNA	engl. small interfering RNA
t	engl. time (= Zeitpunkt)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	engl. tris buffered saline
TBST	engl. tris buffered saline with Tween20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3- diol
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

7 Anhang

7.1 Publikationen

7.1.1 Fachzeitschriften

Loss of Dsg2 results in partial EMT and an upregulation of cAMP levels.

Sachs L*, Zeiler J*, Hoffmann J, Spindler V

Manuscript in preparation. *Authors contributed equally (2020)

Loss of Desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells.

Hütz K, Zeiler J, Sachs L, Ormanns S, Spindler V

Molecular Carcinog. 56(8): 1884-1895. (2017)

7.1.2 Kongressbeiträge

Modulation of EGF-R signaling by Desmoglein 2 in pancreatic cancer cells.

Hoffmann J, Schinner C, Dietrich N, Zeiler J, Spindler V

Vortrag auf Kongress: Experimental Biology, Orlando (2019)

Abstract: https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.802.36

Loss of Dsg2 results in partial EMT and an upregulation of cAMP levels.

Sachs L, Zeiler J, Hoffmann J, Spindler V

Posterbeitrag auf Kongress: 112th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, Würzburg (2017)

Abstract Poster 124: <http://anatomische-gesellschaft.de/data/uploads/content/abstract-archiv/2017-posterabstracts112th-doi10.337anatges.2017.0029.pdf>

Desmoglein 2 regulates pancreatic cancer cell migration through modulation of cAMP.

Zeiler J, Sachs L, Hoffmann J, Spindler V

Vortrag auf Kongress: Experimental Biology, Chicago (2017)

Abstract:
https://www.fasebj.org/doi/10.1096/fasebj.31.1_supplement.465.10

Loss of Desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells through ERK activation and Plakoglobin destabilization.

Hütz K, Zeiler J, Waschke J, Spindler V

Vortrag auf Kongress: 111th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft, Göttingen (2016)

Abstract Vortrag 71: <http://anatomische-gesellschaft.de/data/uploads/content/abstract-archiv/2016-vortrag.pdf>

7.2 Danksagung

Mein überaus großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Volker Spindler für die Überlassung des Themas und die äußerst professionelle und strukturierte Betreuung. Weiter möchte ich ihm für sein unermüdliches persönliches Engagement, die immer positive Motivation und das stets offene Ohr danken. Auch über das Labor und die Promotion hinaus konnte ich mir zu jedem Zeitpunkt seiner Unterstützung und Anerkennung gewiss sein. Mit seiner verständnisvollen und besonnenen Art sowie seiner Begeisterung für die Wissenschaft, war er für mich der ideale Betreuer und Doktorvater. Ganz besonders möchte ich ihm darüber hinaus für die Möglichkeit danken, die Daten unserer Arbeitsgruppe auf dem Kongress Experimental Biology in Chicago präsentieren zu dürfen.

Herzlich möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls I danken, speziell den technischen Assistenten/innen, die zu jedem Zeitpunkt, egal ob formal zuständig oder nicht, uns Doktoranden mit Rat und Tat zur Seite standen. Weiter danke ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern/innen für die vielen interessanten Diskussionen, sowie technischen und experimentellen Hilfen. Besonders danken möchte ich Frau Dr. Lena Sachs für die gute Zusammenarbeit im Tumor-Projekt, sowie Frau Dr. Mariya Radeva für die vielen Diskussionen und Hilfen mit molekular-genetischen Methoden. Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke für die Bereitstellung der infrastrukturellen Voraussetzungen und die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Doktoranden-Kollegen/innen bedanken, namentlich Bernd, Elias, Marco, Marie, Matze, Lisa und Lukas. Ich danke ihnen für die ständige gegenseitige Unterstützung im Labor, speziell den älteren Doktoranden für die Weitergabe ihres Wissens und für die vielen schönen gemeinsamen Stunden in- und außerhalb des Labors.

Ganz besonders möchte ich hier auch meinen extrem engagierten und gewissenhaften Korrekturlesern Waltraud Eggert-Kruse und Sven Olaf Rohr danken.

Überaus wichtig ist es mir, auch meinen Freunden zu danken. Ohne ihre Unterstützung und unermüdliche Motivation auf den verschiedensten Ebenen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders erwähnen möchte ich hier Sven,

Ramin, Kristina und Samuel. Nicht zuletzt danke ich Alice für ihre Unterstützung und stetige Motivation in der Endphase dieser Promotion.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern. Sie haben mir das Medizinstudium und damit die Promotion ermöglicht. Ihre Liebe, ihr Stolz und ihre bedingungslose Unterstützung gaben mir stets die Kraft meine Ziele zu verfolgen.

7.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Julian David Sebastian Zeiler erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Der Einfluss von Desmoglein 2 auf die Malignität von Pankreaskarzinom-Zelllinien“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 24.06.2021

Julian D. S. Zeiler